

Maria Kraft

ÜBER DIE STRAHLENEMPFFINDLICHKEIT
VON BAKTERIEN

1963
Frankfurt am Main 1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546708_0053

Aus dem Max Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. B. Rajewsky

Über die Strahlenempfindlichkeit von Bakterien.

(Zur Frage der kleinsten biologisch wirksamen Strahlendosis)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Maria Kraft

aus

München

1962

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Frankfurt am Main.

Dekan : Prof. Dr. Th. Wieland

1. Referent: Prof. Dr. B. Rajewsky

2. Referent: Priv.Do. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 1963

Inhalt.

Seite

1	Einleitung und Problemstellung
9	Methodik
	Ergebnisse
17	1) Rein exponentieller Verlauf der Dosiseffekt- kurven
23	2) Abhängigkeit der D_{37} vom Kulturalter
33	3) Wachstum in flüssigem Nährmedium nach der Bestrahlung
	Diskussion
43	1) "Kleinste biologisch wirksame Dosis"
65	2) Abhängigkeit der D_{37} vom Kulturalter
75	3) Wachstum in flüssigem Nährmedium
87	Zusammenfassung
	Literatur

Einleitung und Problemstellung.
=====

- 1) Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, zu untersuchen, ob es bei Mikroorganismen, speziell bei *E. coli* B, eine kleinste biologisch wirksame Dosis gibt.
- 2) Die Strahlenreaktion erweist sich als stark vom physiologischen Zustand der Bakterien abhängig. Die Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Kulturalter, vom Nährmedium und vom Belüftungszustand wird untersucht.
- 3) Es wird schließlich gezeigt, daß auch scheinbar "ungeschädigte", voll koloniebildungsfähige Bakterien in ihrem weiteren Verhalten durch die Strahlung bzw. die Anwesenheit strahlengetöteter Bakterien beeinflusst werden.

Lange Zeit galt die "Tötung" von Bakterien durch ionisierende Strahlen als typisches Beispiel für einen Eintreffervorgang. Unter "Tötung" versteht man dabei die Unfähigkeit eines Bakteriums, eine makroskopisch sichtbare Kolonie zu bilden. Man nimmt dabei also an, daß das Bakterium einen empfindlichen Bereich besitzt; findet ein Treffer, z.B. eine Ionisation, in diesem Bereich statt, so wird es abgetötet, im anderen Fall bleibt es voll vermehrungsfähig. Die Dosiseffektkurve, die man aus dieser Annahme ableiten kann, ist eine Exponentialfunktion:

$$N = N_0 e^{-vD}$$

N_0 = Zahl der ursprünglich vorhandenen Bakterien

N = Zahl der überlebenden Bakterien

v = Treffvolumen

D = Dosis in Elementarereignissen pro Volumeneinheit

Tatsächlich wurden in sehr vielen Fällen derartige exponentielle Dosiseffektkurven bei der Bestrahlung von Bakterien

beobachtet; zahlreiche Literaturangaben darüber findet man in zusammenfassenden Arbeiten, wie Jordan (67), Timoffeef - Ressovsky und Zimmer (113), Lea (78), Hollaender (48, 49).

Beim Vorliegen eines wirklichen Eintreffervorganges wäre es nun aber ganz aussichtslos, nach einer "kleinsten biologisch wirksamen Dosis" zu suchen, denn dann kann ein Bakterium auch durch eine beliebig kleine Dosis abgetötet werden, wenn es zufällig einen Treffer gerade in seinen empfindlichen Bereich bekommen hat.

Indessen wurde keineswegs in allen Fällen bei der Bestrahlung von Bakterien eine exponentielle Dosis-Effekt-Kurve gefunden, also eine Gerade in halblogarithmischer Darstellung, sondern im Laufe der Zeit auch immer häufiger S-förmige Kurven. Diese lassen sich formal durch Mehrtrefferkurven darstellen. Daher wurden diese Ergebnisse zunächst mit dem Hinweis abgetan, sie seien durch mangelhafte Versuchstechnik bedingt, insbesondere durch Klumpenbildung der Bakterien. (Wyckoff, 120, 121, 122; Wyckoff and Rivers, 123). Pugsley et al. (92) untersuchten Bakterien, die bei Röntgenbestrahlung sigmoide Überlebenskurven lieferten, (*Sarcina lutea*), mikroskopisch, bestimmten den Grad der Klumpenbildung, rechneten die Dosiseffektkurven auf Einzelbakterien um und fanden nun exponentielle Kurven.

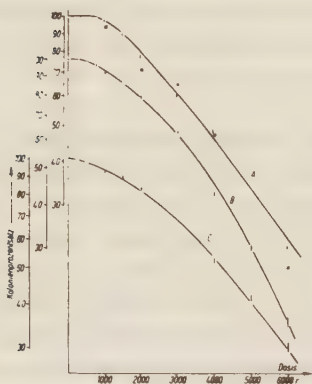
Später veröffentlichten jedoch andere Autoren sigmoide Überlebenskurven und betonten dabei, daß sie bei den von ihnen untersuchten Bakterien keine Klumpung hatten feststellen können. Luria (82) bestrahlte *Bacterium coli* auf der Oberfläche von Gelatine mit Po- α -Teilchen und Röntgenstrahlen. Mit α -Teilchen erhielt er eine exponentielle Dosiseffektkurve, mit Röntgenstrahlen dagegen eine Zweitrefferkurve mit der Gleichung $N/N_0 = (1 + \alpha D) e^{-\alpha D}$. Er führte eine statistische Untersuchung seiner Ergebnisse durch und gibt die Fehlergrenzen der Meßpunkte an. Diese sind allerdings ziemlich groß. Er betont, daß bei halblogarithmischer Darstellung die Punkte systematisch bei kleinen Dosen oberhalb und bei großen Dosen unterhalb einer mittleren Geraden liegen und sieht das als starken Beweis gegen das Vorliegen eines Eintreffervorganges an. Völlig schlüssig erscheint dieser Beweis jedoch nicht, da nur 5 Meßpunkte insgesamt vorliegen. Weiterhin untersuchte Luria nicht nur die Bildung makroskopisch sichtbarer Kolonien, sondern er beobachtete auch

unter dem Mikroskop das Verhalten der strahlengeschädigten Bakterien und stellte dabei fest, daß einzelne völlig unverändert liegenbleiben ("mort immédiate"), andere sich noch 2 - 3 mal teilen und dann liegenbleiben, während wieder andere zu langen Fäden auswachsen, von denen ein Teil liegenbleibt, während andere sich später noch teilen und normale Kolonien liefern. Dazu kommen dann die völlig ungeschädigten Bakterien, die sich ganz normal entwickeln. Aus diesem unterschiedlichen Verhalten der strahlengeschädigten Bakterien schließt er nun, das verträge sich nicht mit dem mathematisch einfachen Formalismus der Treffertheorie. Denselben Einwand machen Engelhard und Houtermans (29, 30), welche *E. coli* nach UV-Bestrahlung untersuchten und verschiedene Schädigungsformen fanden.

Rajewsky und Dänzer (96) zeigten jedoch, daß man auch eine Eintrefferkurve erhält, wenn ein Organismus mehrere Treffbereiche besitzt, falls es für die Abtötung genügt, daß ein einziger dieser Bereiche getroffen wird. Und es ist kein Grund ersichtlich, weshalb das Absterben nicht auf unterschiedliche Weise vor sich gehen sollte, je nachdem, welcher dieser Bereiche nun tatsächlich getroffen wurde.

Weitere Kritik an der Annahme eines Eintreffervorgangs bei der Bakterieninaktivierung übt Houtermans (60, 61). Sie zitiert eine ganze Reihe von Arbeiten, in denen Abweichungen vom exponentiellen Verlauf der Dosiseffektkurven gefunden wurden derart, daß die Kurve bei höheren Dosen steiler wurde, also einer Mehrtrefferkurve ähnelt: Luria (82) (*Bact. coli*, Stamm nicht angegeben, weiche Röntgenstrahlen), Holweck (56) und Lacassagne (75) (*Pseudomonas pyocyanea*; weiche Röntgenstrahlen: 4 Treffer, harte: exponentiell), Hollaender et al. (54) (*E. coli* B/r und B, 250 kV-Röntgenstrahlen; bei aerob gewachsenen Kulturen Eintreffer-, bei anaerob gewachsenen 4- bzw. 24-Trefferkurven, je nach Bestrahlung unter O_2 oder N_2), Engelhard und Houtermans (29) (*E. coli* HIG, α -Strahlen und UV), Anderson (4) (*E. coli* B und B/r, UV, Reaktivierung durch Wärme und Licht; B/r: Mehrtreffer, B: nahezu Eintreffer, wesentlich weniger gekrümmte Kurven als bei B/r, Messung über 4 - 5 Dekaden), Mefferd and Campbell (84) (Sporen von *B. stearothermophilus* und *B. globigii*; UV).

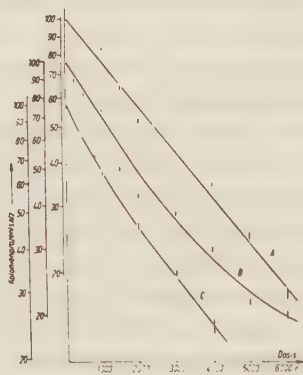
Sie betont, daß eine Nullpunktstangente mit endlicher Steigung bei den Dosiseffektkurven die einzige Erscheinung ist, die nur auf Grund des Eintreffmodells befriedigend gedeutet werden kann. Sie macht dann eigene Untersuchungen mit kleinen Strahldosen an *E. coli* HIG. Dabei beobachtet sie die Bildung von Mikrokolonien mit mindestens 100 Einzelbakterien unter dem Mikroskop. Sie findet bei "jungen" Kulturen (6 Std.) gekrümmte Dosiseffektkurven mit näherungsweise wagrechter Anfangstangente, bei "alten" Kulturen (24 Std.) dagegen exponentielle (Abb. 1 und 2). Allerdings sind diese Ergebnisse nicht völlig mit denen anderer Arbeiten vergleichbar, da normalerweise die Bildung makroskopisch sichtbarer Kolonien untersucht wird. Alper (3) fand beispielsweise unterschiedliche Dosiseffektkurven für die Bildung von makroskopisch sichtbaren und Mikrokolonien.



Inaktivierungskurven von
E. coli bei 50-kV-Röntgenbestrahlung
(J-Kulturen), Kulturalter
6 Stunden.

A: Nulleffekt 0,05%
B: Nulleffekt 1,0 %
C: Nulleffekt 1,0 %
<: mit Plattenzählverfahren
ermittelt

Abb. 1.



Inaktivierungskurven von
E. coli bei 50-kV-Röntgenbestrahlung
(A-Kulturen).

A: Nulleffekt 3,0%
B: Nulleffekt 5,5%
C: Nulleffekt 7,0%

Abb. 2.

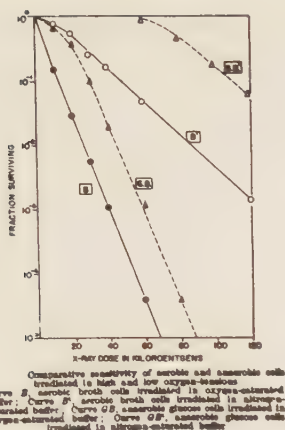


Abb. 3.

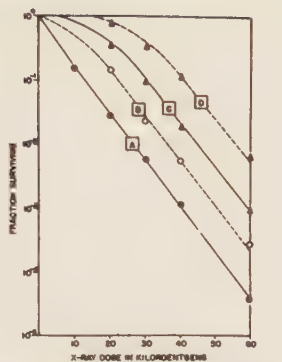
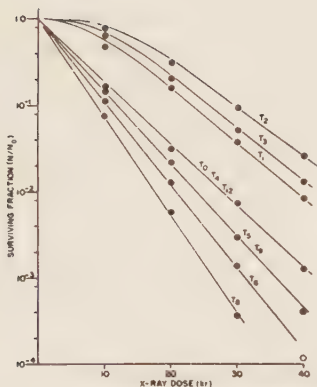
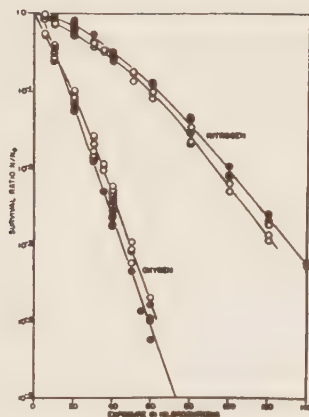


Abb. 4.



Surviving fraction as a function of X-ray dose for cells of various ages. T_0, T_1, T_2 , etc. represent cells taken from growing culture at time zero, 1 hr, 2 hr, etc. from the time of inoculation.

Abb. 5.



X-ray survival curves of the streptomycin-dependent strain (O) and of the purkinian strain (●) irradiated in oxygen or nitrogen

Abb. 6.

(Abb. 3 und 4: aus Hollaender, Stapleton and Martin, Nature 167 (1951) 103-104, Fig. 1 und 2)

Abb. 5: aus Stapleton, J. Bact. 70 (1955) 357-362, Fig. 2

Abb. 6: aus Anderson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 37 (1951) 340-349 Fig. 1

Hollaender et al. (54) sowie Stapleton (105, 106, 107) machten die Beobachtung, daß die Form der Überlebenskurve nach Röntgenbestrahlung von *E. coli* B/r abhängig ist von den Kulturbedingungen vor der Bestrahlung, vom Sauerstoffdruck während der Bestrahlung und vom Wachstumsstadium der Kultur (Abb. 3 - 5). Nach den Angaben dieser Autoren wurden bei *E. coli* B ganz entsprechende Ergebnisse gefunden, es ist jedoch keine Kurve veröffentlicht. Die Bakterien wurden in flüssigem Medium bestrahlt, danach wurde die Koloniebildung auf der Oberfläche von Nähragar untersucht.

Eine ganz analoge Änderung der Dosiseffektkurven je nach den Bestrahlungsbedingungen fand Anderson (5) an zwei anderen Stämmen von *E. coli* (Abb. 6).

Dieselben Resultate fanden Stapleton et al. (110, 111) auch an Sporen von *Aspergillus terreus*.

Dagegen fanden Kohn und Gunter (71) bei einem Stamm *E. coli* B/r, den sie von Stapleton erhalten hatten, unter denselben Versuchsbedingungen, bei denen Atwood und Stapleton (7) sigmoide Überlebenskurven erhalten hatten, eine exponentielle Dosiseffektkurve. Atwood und Stapleton verwendeten Co- γ -Strahlung (1,1 MeV), Kohn und Gunter Röntgenstrahlen von 1000 kV. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse wird nicht angegeben.

Wieder ein anderes Ergebnis fanden Howard-Flanders und Alper (62). Sie beobachteten bei *E. coli* B/r, genau wie Hollaender et al. (54), einen mehr oder weniger wagrechten Beginn der Dosiseffektkurve, abhängig von der Belüftung der Bakterienkultur vor und während der Bestrahlung, bei *E. coli* B dagegen änderte sich die Form der DEK von Kultur zu Kultur, war in einigen Fällen exponentiell und in anderen sogar nach höheren Dosen zu flacher werdend, also gerade umgekehrt wie bei *E. coli* B/r, während Hollaender et al. ein gleichartiges Verhalten der beiden Stämme angegeben hatten. Ein Zusammenhang zwischen Belüftung und Kurvenform wurde bei *E. coli* B hier nicht gefunden.

Zuvor hatte Alper (2) Ergebnisse mit *E. coli* B veröffentlicht, bei denen sich die Neigung der Dosiseffektkurve in Abhängigkeit vom O_2 -Druck während der Bestrahlung änderte; die Kurvenform war jedesmal exponentiell.

Burnett et al. (17) fanden exponentielle Dosiseffektkurven bei Röntgenbestrahlung von *E. coli* B/r (250 kV), sowohl bei belüfteten Kulturen als auch bei Kulturen, aus denen der Sauer-

stoff durch Zufügen von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ chemisch entfernt war. Die Bakterien wurden in flüssigem Medium bestrahlt, danach mit geschmolzenem Nähragar vermischt und in Petrischalen ausgegossen, um die Koloniebildung zu untersuchen.

Ebenso fanden Howard-Flanders und Moore (63) bei Bestrahlung von *Shigella flexneri* mit Elektronen von 1,2 MeV aus einem Van de Graaff - Generator mit und ohne Sauerstoff exponentielle Dosiseffekturven. Sie bestrahlten die Bakterien auf der Oberfläche von Cellophan, das mit einer dünnen Gelatineschicht bedeckt war, schwemmten sie nach der Bestrahlung ab und untersuchten die Bildung von Oberflächenkolonien auf Nähragar.

Schließlich beobachteten auch Pollard und Macauley (91) exponentielle Dosiseffekturven bei der Bestrahlung von *E. coli* B mit Co- γ -Strahlung sowohl unter der Einwirkung von O_2 als auch von N_2 . Nur die Neigung der Kurven war geändert. Sie bestrahlten in flüssigem Medium und untersuchten die Bildung von Oberflächenkolonien auf Nähragar.

Man sieht, die Ergebnisse sind recht widersprüchlich, es wurden sowohl exponentielle als auch sigmoide Dosiseffekturven gefunden. Das läßt sich zum Teil erklären durch verschiedene Versuchstechnik, Verwendung verschiedener Organismen oder verschiedener Stämme eines Organismus und verschiedene Strahlungen. Im Abschnitt "Diskussion" wird diese Frage noch näher behandelt werden.

Gegen alle diese Arbeiten, mögen sie nun für oder gegen das Eintreffmodell der Strahlenwirkung sprechen, läßt sich jedoch der Einwand erheben, daß zu wenig Meßpunkte vorliegen, daß diese zu sehr streuen oder daß überhaupt keine Fehlergrenzen angegeben sind. Außerdem wurde die Strahlenwirkung im allgemeinen nur bis herunter zu einer Dosis von 1-2 kr, in seltenen Fällen einigen 100 r, untersucht. (Houtermans (61): bis 200 r, Biagini (10): in anderem Zusammenhang eine Messung bis 100 r, keine Fehlergrenze angegeben und nur 4 Meßpunkte insgesamt auf der Kurve). Über den genauen Verlauf der Inaktivierungskurve der Bakterien bei sehr kleinen Dosen ist praktisch nichts bekannt. Der Grund dafür ist natürlich die bekannte Schwierigkeit, bei sehr kleinen Inaktivierungsraten noch eine ausreichende Meßgenauigkeit zu erhalten.

So erschien es sinnvoll, einmal den Verlauf der Dosiseffekt-kurve für *E. coli* B bis herab zu einer Dosis von 60 r mit hoher Genauigkeit zu untersuchen. Die Genauigkeit wurde dadurch erreicht, daß pro Meßpunkt eine möglichst hohe Koloniezahl (etwa 5000 - 10000) gemessen wurde, daß auf der Dosiseffektkurve die Punkte möglichst dicht gelegt wurden und daß außerdem jede Messung mehrmals wiederholt wurde. Da, wie oben erwähnt, hauptsächlich Hollaender und Stapleton einen Einfluß des Nährmediums, des Kulturalters und der Belüftung auf die Form der Überlebenskurve gefunden hatten, wurden die Bakterien in drei verschiedenen Nährmedien, in verschiedenen Wachstumsstadien und unter verschiedenen Belüftungsbedingungen untersucht. Alper (3) berichtete von einer deutlichen Verlängerung der lag-Phase von *E. coli* B bei einer Bestrahlung mit nur 300 rad sowie einen Einfluß der Bestrahlung auf die Verdopplungszeit der Bakterien. Daher wurde auch das Wachstum der Bakterien in flüssigem Nährmedium nach Bestrahlung in die Untersuchungen mit einbezogen.

E. coli B wurde als Objekt gewählt, weil einerseits das Bacterium coli recht genau untersucht ist und so viele gute Vergleichsmöglichkeiten vorliegen; andererseits gibt es über den Stamm B relativ wenige Arbeiten, da die meisten Messungen an *E. coli* B/r durchgeführt sind.

Methodik.

=====

1) Versuchsobjekte.

Für die Versuche wurden Bakterien verwendet, und zwar Escherichia coli Stamm B.

2) Kultur der Bakterien.

Eine Stammkultur der Bakterien wurde auf Schrägagar im Eis=schrank bei 0° C aufbewahrt. Zu den Versuchen wurde mit einer sterilen Platin-Öse etwas von der Schrägagarkultur in flüssiges Nährmedium übergeimpft und bei 37° C bebrütet, bis die statio=näre Phase erreicht war. Als Nährmedium diente:

- a) Nutrient Broth (Difco) 0,8 % + 0,5 % NaCl
- b) Bacto-Tryptone (Difco) 1 %
- c) C - Medium + 0,4 % Glucose

Bacto-Tryptone enthält Trypsin-verdautes Kasein.

C-Medium (nach Roberts et al. (102)) ist ein synthetisches Nährmedium, das nur aus anorganischen Salzen besteht, und dem als Energiequelle Glucose zugefügt wird. Seine Zusammensetzung ist:

2,0 g NH_4Cl
7,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
3,0 g NaCl
0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
3,0 g KH_2PO_4

in 1 Liter Wasser.

Die Bebrütung erfolgte in Reagenzgläsern, die ca. 10 ml Nährmedium enthielten und mit Kapsenbergkappen verschlossen waren, praktisch anaerob.

Die Bebrütungsdauer war 15 - 24 Stunden, in den meisten Fällen 18 oder 20 Stunden.

Die so erhaltenen Bakterienkulturen wurden teils sofort für die Bestrahlung verwendet, teils wurde eine genau definierte Menge davon in neues Nährmedium übergeimpft und nochmals eine bestimmte Zeit gebrütet, mit oder ohne Belüftung, je nach dem Versuch. Das Wachstum mit Belüftung erfolgte in Erlenmeyerkolben, in welche eine Glasritze eingeführt war, durch die mittels einer kleinen Membranpumpe Luft geblasen wurde (Abb. 7).

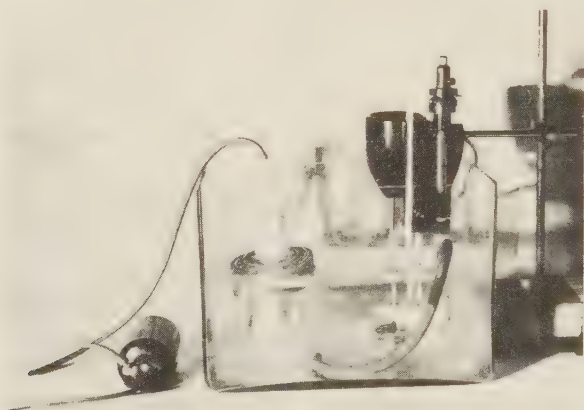


Abb. 7.

Die zur Bestrahlung bestimmte Bakteriensuspension wurde in einem Reagenzglas in Eiswasser gestellt und so bis kurz vor der Bestrahlung auf 0°C gehalten. Im allgemeinen wurde die Bakterienkultur, so wie sie war, bestrahlt; in einigen Fällen wurden die Bakterien abzentrifugiert und mit Pufferlösung gewaschen. In den Ergebnissen zeigte sich dabei praktisch kein Unterschied. Dieselbe Pufferlösung wurde auch nach der Bestrahlung zum Verdünnen der Bakterien verwendet; es handelte sich dabei um

0,5 % NaCl in M/100 Na-K-Phosphatpuffer, pH 6,8 oder

0,5 % NaCl in M/50 Na-K-Phosphatpuffer, pH 7,0.

Bei beiden Pufferlösungen wurden dieselben Versuchsergebnisse beobachtet.

Vor dem Versuch wurden alle benötigten Nährlösungen etc. 1 Stunde bei 120°C im Autoklaven sterilisiert. Glasgeräte und Bestrahlungsschälchen wurden 2 Stunden bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert.

3) Bestrahlung der Bakterien.

Die Bestrahlung erfolgte in Aluminiumschälchen von 2 cm Durchmesser und 0,5 mm Wand- und Bodenstärke, in die jeweils 1 ml Bakteriensuspension pipettiert wurde. Die Schichtdicke der bestrahlten Bakteriensuspension war also 3 mm.

a) Constantos.

Für die Bestrahlung der Bakterien wurde zunächst die "Constantos" - Röntgenröhre verwendet. Sie liefert nur eine geringe Dosisleistung. Daher wurde ein Bestrahlungstischchen in die Röhrenhaube eingesetzt, um möglichst nahe an den Fokus heranzukommen (Abb. 8).

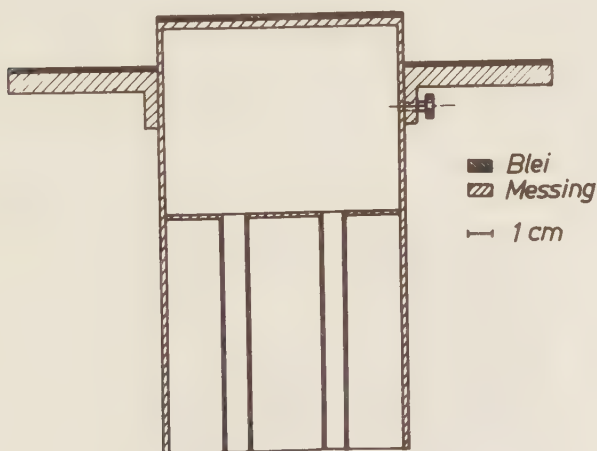


Abb. 8.

Das Tischchen bestand aus Messing mit einer Bleiauflage. Es wurde mit Eiswasser gefüllt, so daß die Bakterien während der Bestrahlung auf 0° C gehalten wurden. Es besaß eine Skala mit mm - Einteilung, so daß es immer sehr genau auf denselben Fokusabstand eingestellt werden konnte.

Die Bestrahlungsbedingungen waren:

100 kV, 2 mA, 0,5 mm Al-Filter, 16,5 cm F.A., 60 r/min.

Die Dosisleistung wurde durch eine Eichmessung bestimmt, bei der in verschiedenen Abständen von 20 - 45 cm vom Fokus die Dosisleistung mit dem Siemens-Universaldosimeter und Fingerhutkammer gemessen wurde. Die erhaltenen Werte befolgten sehr gut das $1/r^2$ - Gesetz; aus ihnen wurde die Dosisleistung in 16,5 cm Fokusabstand zu 60 r/min berechnet. Bei der Bestrahlung der Bakterien wurden immer dieselben Bedingungen eingehalten.

Wegen des geringen Fokusabstandes fiel die Dosisleistung gegen den Rand des Bestrahlungsfeldes hin rasch ab, daher wurde immer nur ein Schälchen nach dem anderen bestrahlt; dabei wurde das Schälchen genau in die Mitte des Bestrahlungstischchens gesetzt. Das Tischchen wurde vor dem Aufsetzen des ersten Schälchens kurz mit einem Bunsenbrenner abgeflammt, um eine Verunreinigung durch Fremdkeime zu vermeiden.

Die Bestrahlungsdauer war 1 - 30 min. Sie wurde mit einer Stoppuhr gemessen. Die "Constantos"-Röntgenröhre besitzt einen Bleiverschluß, der sich in weniger als 0,5 sec öffnen oder schließen läßt, so daß also die Ungenauigkeit in der Bestimmung der Bestrahlungszeit kleiner als 1 % war.

b) Isovolt.

Nach einiger Zeit stand die "Constantos"-Röntgenröhre nicht mehr für Bestrahlungen zur Verfügung. Von da an wurden die Bakterien mit der "Isovolt"- Röntgenröhre bestrahlt. Diese lieferte eine höhere Dosisleistung, daher konnten die Bakterien in ca. 30 cm Fokusabstand bestrahlt werden. Hier war das Bestrahlungsfeld so gleichmäßig, daß alle Bestrahlungsschälchen gleichzeitig unter die Röhre gestellt werden konnten, im allgemeinen 7 Stück, die sich nahezu kreisförmig anordnen lassen. Es wurden Unterschiede der Dosisleistung von ± 2 % zwischen Mitte und Rand des Bestrahlungsfeldes gemessen, dabei waren die Werte am "Rand" ungefähr 5 cm weiter außen gemessen, als das äußerste Bestrahlungsschälchen normalerweise stand.

Die "Isovolt"- Röntgenröhre besitzt keinen Bleiverschluß, daher war es bei den verwendeten kurzen Bestrahlungszeiten nicht möglich, sehr exakt nach Zeit zu dosieren. Deshalb wurde immer während der Bestrahlung die eingestrahlte Dosis mit dem Siemens-Universaldosimeter und Fingerhutkammer gemessen. Die Kammer wurde so eingestellt, daß ihre Mitte denselben Fokusabstand hatte wie die Bakteriensuspension.

Vor der Bestrahlung wurde die Röhre auf eine Dosisleistung von etwa 60 r/min eingestellt. Dabei kamen Abweichungen bis $\pm 5\%$ vor, die aber ohne Bedeutung sind, da ja die Dosis während der Bestrahlung gemessen wurde. Es sollten nur größere Schwankungen der Dosisleistung vermieden werden.

Die Bestrahlung erfolgte bei 170 ± 10 kV, 10 mA, 1 mm Al - Filter. Während der Bestrahlung waren die Bestrahlungsschälchen mit der Bakteriensuspension in einer sterilen Petrischale, die auf einem Aluminiumklotz stand, welcher sich in einem Gefäß mit Eiswasser befand. Die Petrischale stand schon einige Zeit vor dem Einsetzen der Schälchen auf dem Aluminiumklotz, damit sich die Temperatur einstellen konnte (Abb. 9).

Die Justierung der Bestrahlungsanordnung unter der Röhre geschah mit Hilfe eines kleinen Lotes, das in der Mitte einer kreisrunden Pappscheibe befestigt war, die genau unter die Öffnung der Röhrenhaube gehalten wurde. Der Endpunkt des Lotes mußte nun auf die Mitte der Petrischale zeigen.

Je nach der Art des Versuches wurden alle Bestrahlungsschälchen zu Beginn der Bestrahlung unter die Röhre gestellt und dann der Reihe nach weggenommen, wenn die entsprechende Dosis eingestrahlt war, oder das am längsten zu bestrahlende Schälchen wurde zuerst untergestellt und die anderen dann der Reihe nach hinzugefügt.

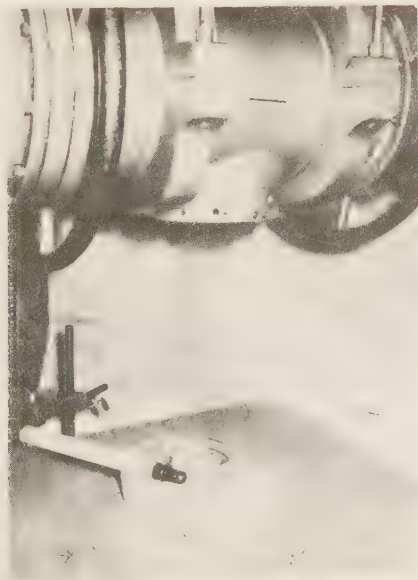


Abb. 9.

4) Behandlung der Bakterien nach der Bestrahlung.

Als Test auf die Strahlenschädigung wurde die Koloniebildungsfähigkeit der Bakterien in Nähragar sowie das Wachstum in flüssigem Nährmedium untersucht.

a) Wachstum in Nähragar.

Nach der Bestrahlung wurden die Schälchen mit einer ausgeglühten Pinzette ergriffen und in kleine Erlenmeyerkolben geworfen, die je 10 ml Pufferlösung enthielten und in einer Schale mit Eiswasser standen. Danach wurden die Bakterien weiter verdünnt, indem immer 1 ml in 10 ml Pufferlösung überpipettiert wurde. Die Verdünnung war also bei jeder Stufe 1 : 11. Die Reagenzgläser mit der Pufferlösung standen ebenfalls in Eiswasser. Die nötige Verdünnung wurde jeweils zu Beginn der Versuchsserien durch einen Vorversuch festgestellt.

Als Nährboden für die Bakterien diente Nutrient Agar (Difco) + 0,5 % NaCl. Beim Ausplatten wurde eine Drei-Schichten-Methode angewendet. Zunächst wurden jeweils ungefähr 10 ml Nähragar in Petrischalen gegossen und erstarren gelassen. Auf diese Grundschicht wurde die verdünnte Bakteriensuspension pipettiert und mit 5 ml flüssigem Nähragar von 40 - 45° C vermischt. Nachdem diese Schicht erstarrt war, wurde noch eine Deckschicht von 5 ml Nähragar darübergegossen (Abb. 10). Der Agar für die Mittel- und Deckschicht war in Reagenzgläser aufgefüllt und wurde in einem Wasserbad von 45° C flüssig gehalten.

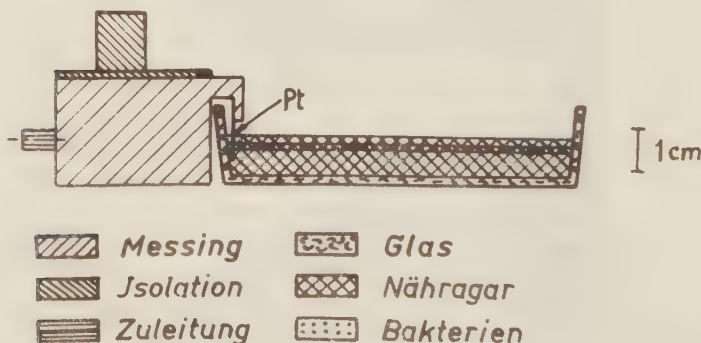


Abb. 10.

Danach wurden die Schalen in den Brutschrank gestellt und ungefähr 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Nach dieser Zeit haben sich alle koloniebildungsfähigen Bakterien zu makroskopisch sichtbaren Kolonien entwickelt (Abb. 11). Durch längere Bebrütung nehmen nur die einzelnen Kolonien an Größe zu.

Die Kolonien wurden nun mit einem elektrischen Zählgerät halbbautomatisch gezählt. Die eine Elektrode war mit einem Stück Platinblech versehen, das in den Agar eingesteckt wurde. Die

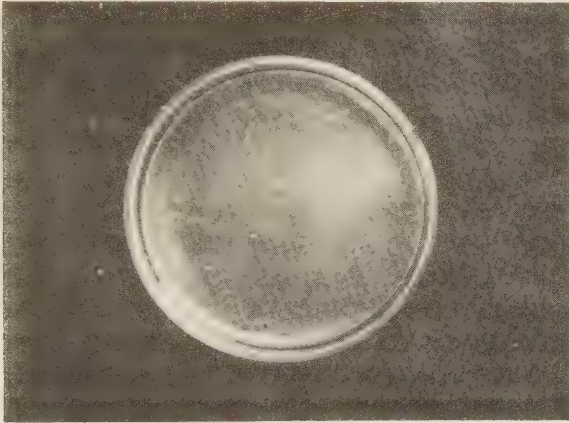


Abb. 11.

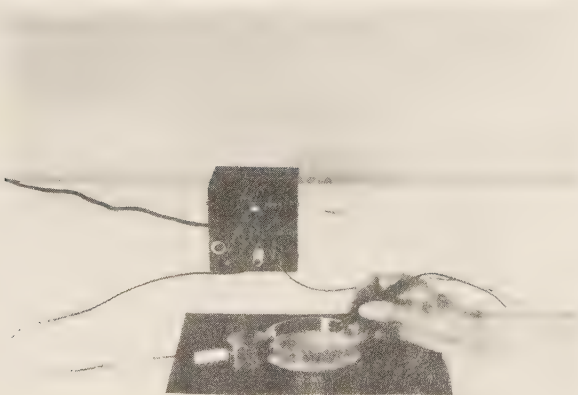


Abb. 12.

andere Elektrode war eine Nadel, mit der die Kolonien angestochen wurden, so daß bei jedem Einstechen der Stromkreis geschlossen wurde und das Zählwerk um eine Zahl weitersprang. (Abb. 12).

Es wurde immer so viel von der verdünnten Bakteriensuspension aufpipettiert, daß ca. 1000 Kolonien pro Platte zu erwarten waren, entweder 0,5 oder 1 oder 2 ml der letzten Verdünnung. Abb. 11 zeigt 732 Kolonien. Bei einer geringeren Kolonienzahl werden die statistischen Fehler zu groß, bei einer größeren treten Schwierigkeiten beim Zählen auf. Für jeden Meßpunkt wurden fünf Platten angelegt und der Mittelwert der Kolonienzahlen genommen. Als Fehlerbreite ist der doppelte mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben.

b) Wachstum in flüssigem Nährmedium.

In einer Anzahl Versuche wurde nicht nur die Koloniebildungsfähigkeit der Bakterien nach der Bestrahlung untersucht, sondern auch ihr Wachstum in flüssigem Nährmedium. Die Bakterien wurden wie üblich in Aluminiumschälchen bestrahlt, anschließend in Erlenmeyerkolben mit Nährmedium von 37° C georacht und auch weiterhin bei 37° C bebrütet.

Geprüft wurde die Dauer der Latenzphase, die Verdopplungszeit und die erreichte Endkonzentration der Bakterien. Zu diesem Zweck wurde die Trübung der Bakteriensuspension mit dem Eppendorf-Photometer gemessen, und zwar in Prozent einer Standardtrübung; außerdem wurde von Zeit zu Zeit eine Probe entnommen und auf Petrischalen ausgeplattet. Bei der Trübungsmessung wurde immer die Grundtrübung des Nährmediums ohne Bakterien von dem Meßwert abgezogen. Trübungsmessungen konnten im wesentlichen nur an Bakterien in C-Medium durchgeführt werden, da die Grundtrübung der natürlichen Nährmedien zu hoch ist. Außerdem erreicht die Bakterienzahl in C-Medium einen sehr viel höheren Endwert als in den natürlichen Nährmedien. So kann man in Nutrient broth das Bakterienwachstum mit Hilfe der Trübung nur über wenig mehr als eine Dekade verfolgen, während es sich in C-Medium gut über zwei bis drei Dekaden messen läßt.

Ergebnisse.

=====

1) Rein exponentieller Verlauf der Dosiseffektkurven.

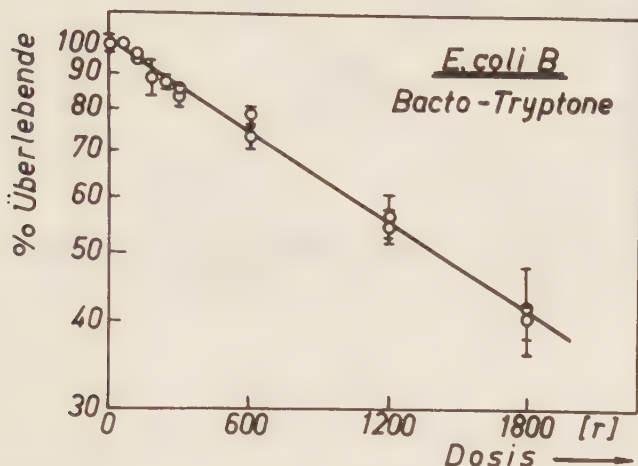


Abb. 13.

In Bacto-Tryptone praktisch anaerob im Reagenzglas gewachsene Bakterien aus der stationären Phase wurden bestrahlt. Die Dosis-effektkurve zeigt einen bis 60 r exponentiellen Verlauf. Der Punkt bei 60 r liegt zwar geringfügig oberhalb der Geraden, doch bleibt diese Abweichung noch im Rahmen der Fehlergrenzen. Wo keine Fehlergrenzen eingezeichnet sind, stimmen diese mit der Größe der Punkte überein. Das gilt auch für die übrigen Darstellungen von Dosiseffektkurven. In Abb. 13 sind die Ergebnisse von verschiedenen Bestrahlungsversuchen eingetragen, die recht gut miteinander übereinstimmen.

Ebenso zeigen praktisch anaerob in Nutrient Broth gewachsene Bakterien aus der stationären Phase eine rein exponentielle Dosiseffektkurve (Abb. 14). In Abb. 14 a ist der Kurvenanfang noch einmal vergrößert herausgezeichnet.

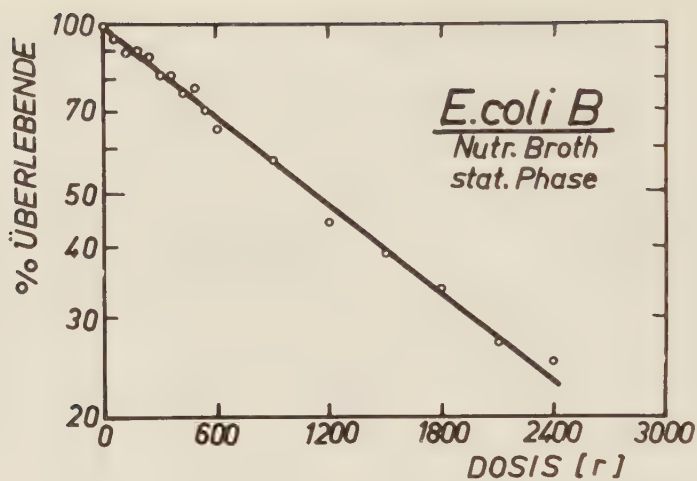


Abb. 14.

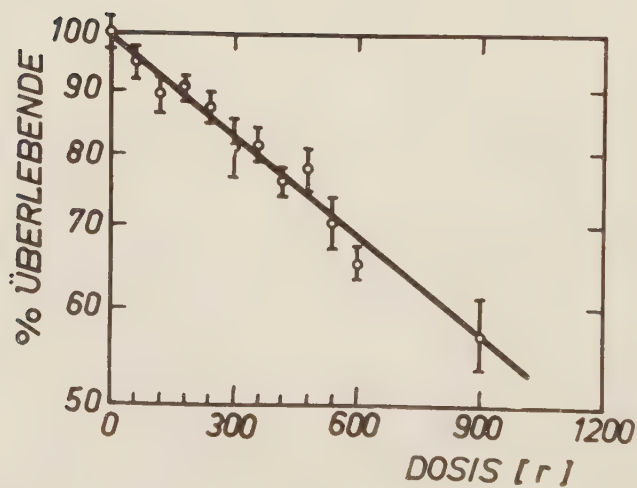


Abb. 14 a.

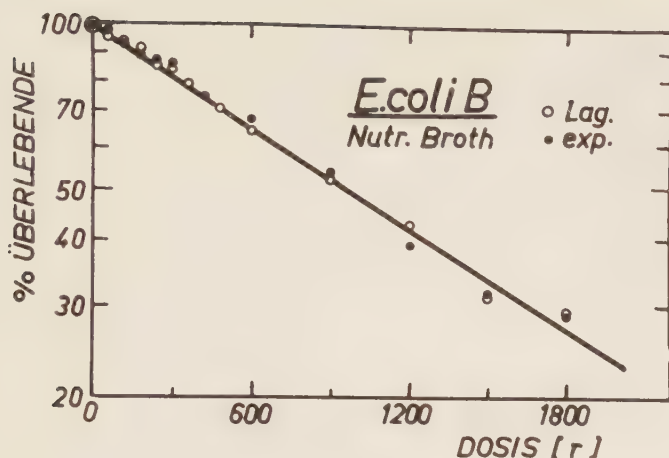


Abb. 15.

Auch das Kulturalter der Bakterien hatte keinen Einfluß auf die Form der Überlebenskurve. Abb. 15 zeigt Bakterien aus der lag-Phase (10 min) und der exponentiellen Wachstumsphase (1Std.) praktisch anaerob in Nutrient Broth gewachsen. Der Verlauf der Dosiseffektkurve ist exponentiell bis 60 r.

In diesem Fall ist auch die Strahlenempfindlichkeit in beiden Wachstumsstadien dieselbe. Das gilt jedoch keineswegs allgemein. Die Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Kulturalter wird in Abschnitt 2) besprochen. In allen Fällen verlief aber die Dosiseffektkurve exponentiell. Es würde zu weit führen, hier sämtliche gemessenen Dosiseffektkurven für die verschiedenen Kulturalter abzubilden.

In den natürlichen Nährmedien Bacto-Tryptone und Nutrient Broth von normaler Konzentration wurden die Bakterien nur praktisch anaerob in Reagenzglasern gezüchtet, da diese Medien bei Belüftung bald stark zu schäumen beginnen. Diese Schwierigkeit besteht nicht bei dem synthetischen C-Medium.

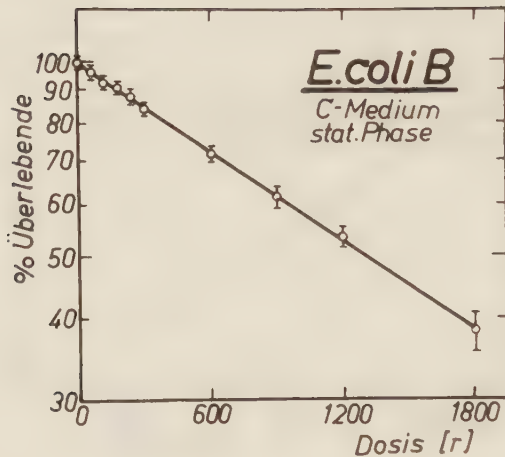


Abb. 16.

Bei praktisch anaerob in C-Medium gewachsenen Bakterien aus der stationären Phase findet man ebenfalls eine bis 60 r exponentielle Dosis-effektkurve (Abb. 16). Dasselbe Ergebnis erhält man mit aerob gewachsenen Bakterien aus der stationären Phase (Abb. 17).

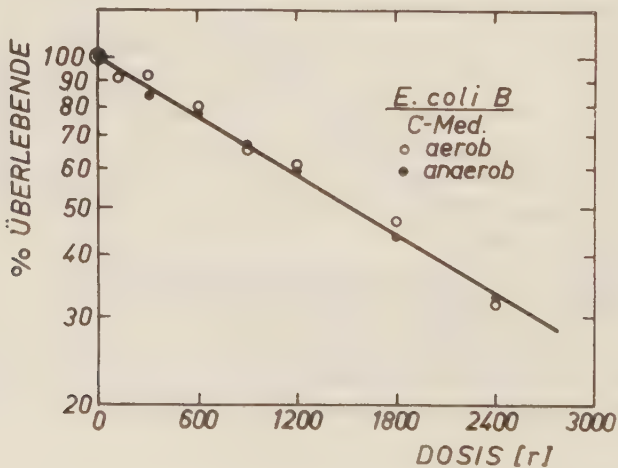


Abb. 17.

Selbst die Strahlenempfindlichkeit war in diesem Fall die gleiche, obwohl sich aerob und anaerob gewachsene Bakterien in ihrem Energiestoffwechsel, der zugehörigen Enzymausstattung und chemischen Zusammensetzung unterscheiden. Anaerob kultivierte Bakterien erzeugen während ihres Wachstums beträchtliche Mengen von Säure, so daß auch in dem gut gepufferten C-Medium der pH-Wert stark absinkt, während er bei aerober Kultur praktisch konstant bleibt. Außerdem wird bei aerober Kultur das Nährmedium viel besser ausgenützt, man erreicht eine etwa 10 mal größere Bakterienkonzentration als bei anaerober Kultur. Trotz aller dieser Unterschiede erwies sich die Größe des "formalen Treffbereichs" als gleich.

Bei diesem Versuch wurde auf ein streng anaerobes Wachstum geachtet. Durch die Nährflüssigkeit in einem Erlenmeyerkolben wurde nach dem Einimpfen der Bakterien zunächst Stickstoff aus einer Bombe geleitet; danach kam der Kolben in einen Glaszylinder, der evakuiert und dann mit Stickstoff gefüllt wurde. Das Ganze kam in den Brutschrank bei 37° C. Bei der Füllung mit Stickstoff wurde ein leichter Unterdruck eingestellt, der auch bis zum Ende der Kultur erhalten blieb, ein Zeichen dafür, daß keine Luft von außen eingedrungen war. Die ganz geringen Sauerstoffreste, die in dem Bombenstickstoff noch enthalten sind, werden bereits im ersten Stadium der Kultur völlig aufgebraucht.

Die aerobe Kultur erfolgte so wie in der "Methodik" beschrieben ist. In beiden Fällen wurden 2 ml Stammkultur in 200 ml frisches Nährmedium eingepimpf; ebenso war die Wachstumsdauer bis zur Bestrahlung dieselbe, nämlich 18 Stunden.

Auch in C-Medium hatte das Kulturalter der Bakterien keinen Einfluß auf die Form der Dosiseffektkurve, sie verlief in allen Fällen exponentiell. Abb. 18 zeigt als Beispiel aerob in C-Medium gewachsene Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase (5 Std.) und der stationären Phase (24 Std.).

Hier zeigt sich indessen eine deutliche Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Kulturalter. Die "jungen" Bakterien aus der exponentiell wachsenden Kultur haben einen doppelt so großen formalen Treffbereich wie die "alten" Bakterien aus der nicht mehr wachsenden Kultur.

Das Wachstum der Bakterien wurde bei diesen Versuchen durch Trübungsmessungen mit dem Eppendorfergerät kontrolliert. Abb. 19 zeigt, an welchen Stellen der Wachstumskurve die Bakterien für den Versuch in Abb. 18 entnommen wurden.

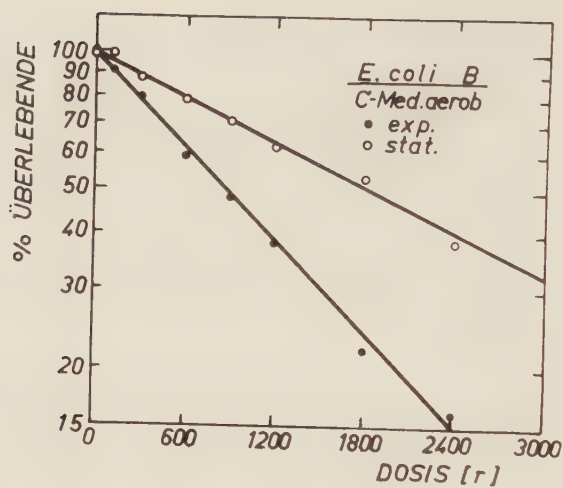


Abb. 18.

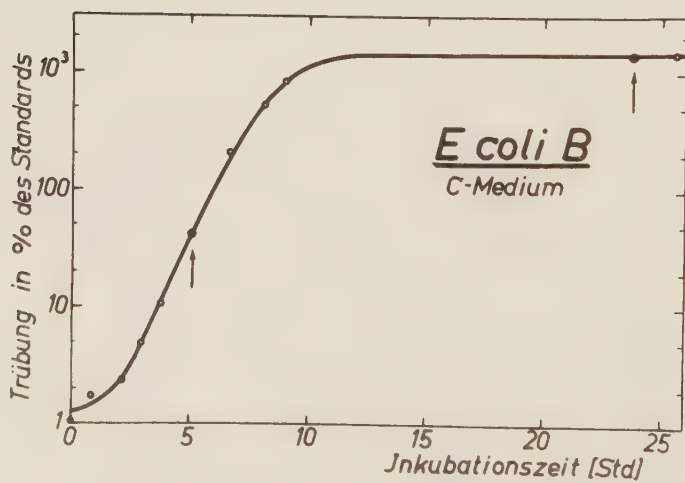


Abb. 19.

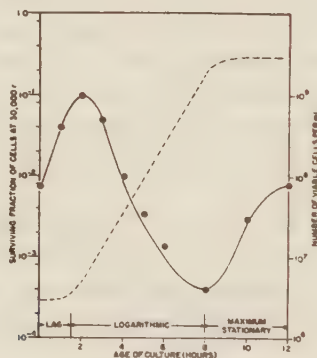
2) Abhängigkeit der D_{37} vom Kulturalter.

Während die Form der Dosiseffektkurven in allen untersuchten Fällen rein exponentiell war, unterschieden sich doch die Bakterien in ihrer Strahlenempfindlichkeit recht merklich von Versuch zu Versuch. Unterschiede in den Kulturbedingungen, also ein mehr oder weniger aerobes oder anaerobes Wachstum im Reagenzglas, kam als Ursache dafür nicht in Frage, da sich die Strahlenempfindlichkeit bei aerober und anaerober Kultur als gleich erwiesen hatte. Es war aber möglich, daß die Kulturen trotz formal gleicher Bebrütungsdauer ein unterschiedliches wahres Alter, vom Beginn der stationären Phase an gerechnet, hatten, denn beim Einimpfen mit der Platinöse konnte es geschehen, daß einmal sehr viele und ein anderes Mal sehr wenige vermehrungsfähige Bakterien in das Nährmedium übertragen wurden. Bei einem Unterschied in der Größe des Inoculums um einen Faktor 1000, wie er durchaus vorkommen konnte, dauert es dann $2_{\log} 1000 \approx 10$ Generationen länger bzw. kürzer, bis die maximale stationäre Phase erreicht ist, das sind etwa 5 Stunden. So können also die einzelnen Kulturen ein ganz verschiedenes "Alter" seit dem Beginn der stationären Phase erreicht haben, obwohl sie vom Einimpfen an gerechnet die gleiche Zeit bebrütet wurden.

Außerdem konnte es sein, daß die Suspension bei der Bestrahlung unterschiedliche Mengen Sauerstoff enthielt, da möglicherweise trotz der geringen Schichtdicke von 3 mm im Bestrahlungsschälchen kein völliger Gasaustausch mit der umgebenden Luft stattfand.

Beide Effekte sind bekannt; über eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit durch Sauerstoff bei den verschiedensten Organismen gibt es zahlreiche Arbeiten, z.B. Alper (2), Anderson (5), Anderson and Turkowitz (6), Burnett et al. (17), Gray et al. (39), Gunter and Kohn (42), Hayden and Smith (45), Hollaender (49, 50, 52), Hollaender et al. (53, 54), Howard-Flanders et al. (62, 63), Loiseleur (79); in Nickson (86) : Barron (8), Giles (33), Hollaender (51), Latarjet (77); Pollard and Macauley (91), Read (98 - 100), Stapleton (105 - 108), Stapleton et al. (109, 110), Thoday and Read (112), Zelle and Hollaender (124) ; die Liste erhebt keineswegs einen Anspruch auf Vollständigkeit.

Ebenso kennt man eine Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vom Kulturalter. Klövekorn und Gaertner (70) stellten bereits 1926 fest, daß frisch anwachsende *Bact. coli* eine höhere Strahlenempfindlichkeit zeigen als 24 Stunden alte. Allerdings waren diese Messungen nicht sehr genau; es wurde einfach eine Öse voll Bakterien aus einer Aufschwemmung auf Nähragar ausgestrichen und untersucht, bei welcher Dosis sich keine Kolonien mehr bilden. Winslow und Walker (118) stellten die bis dahin bekannten Ergebnisse zusammen. Die meisten Untersuchungen zeigten eine höhere Empfindlichkeit "junger" Bakterien gegenüber "alten". In neuerer Zeit veröffentlichte Stapleton (105 - 107) eine Kurve über die Überlebensrate von *E. coli* B/r, die in belüfteter Nutrient Broth gewachsen waren, in verschiedenen Wachstumsstadien (Abb. 20). Eine Abhängigkeit der D_{37} vom Kulturalter ist auch weiter nicht erstaunlich, da die Bakterien in den verschiedenen Wachstumsstadien eine verschiedene Form, Größe und chemische Zusammensetzung haben.



Survival at a constant dose of X-rays as a function of the age of the culture. Dose rate in all experiments was 2000 r per min. - - - , growth curve; —, surviving fraction at 30,000 r for cells at various ages indicated on the abscissae.

Abb. 20.

(aus: Stapleton, J. Bact. 70 (1955) 357 - 362, Fig. 1)

Trotzdem also ein Einfluß des Kulturalters, sowie des Sauerstoffdrucks während der Bestrahlung, auf die D_{37} im Prinzip bekannt war, erschien es doch interessant, den speziellen Verlauf dieses Einflusses unter den vorliegenden Versuchsbedingungen zu verfolgen.

Für diese Versuche wurden aerob in C-Medium gewachsene Bakterien gewählt; es ist hier besonders leicht, sauber definierte Versuchsbedingungen einzuhalten. Der Verlauf der Wachstumskurve läßt sich sehr gut durch Trübungsmessungen kontrollieren, da hier Trübung und Bakterienzahl im gesamten Meßbereich recht genau proportional sind (Abb. 21). Außerdem ist der Übergang zur stationären Phase ziemlich scharf definiert, da er nur durch die vorhandene Nährstoffmenge, also Glucose, bestimmt ist. Bei anaerob in C-Medium wachsenden Bakterien läßt sich zwar der Verlauf der Wachstumskurve ebenfalls gut durch Trübungsmessungen kontrollieren, doch ist hier der Übergang zur stationären Phase sehr ungenau definiert, da die Einstellung des Wachstums mehr durch das Absinken des pH-Wertes als durch die Aufzehrung der Glucose bedingt ist.

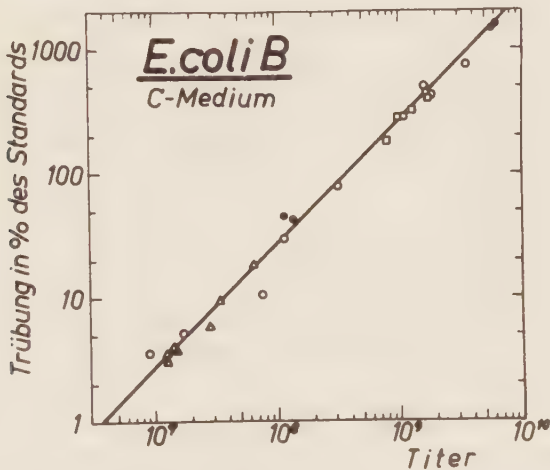


Abb. 21.

Es wurden jeweils 2 ml aus einer praktisch anaerob gewachsenen Stammkultur in 200 ml belüftetes C-Medium von 37° C eingepflegt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben für die Bestrahlung in ein Reagenzglas abgefüllt, das dann sofort in Eiswasser gestellt wurde. Nach dem Abkühlen konnte die Suspension in die Aluminiumschälchen gefüllt und bestrahlt werden.

In einigen Fällen wurde durch die gekühlte Suspension kurz vor der Bestrahlung zusätzlich Luft geblasen. Da sich bei 0° C mehr Sauerstoff in Flüssigkeiten löst als bei 37° C, herrschte also in diesen Proben eine höhere Sauerstoffkonzentration. Abb. 22 zeigt die Ergebnisse.

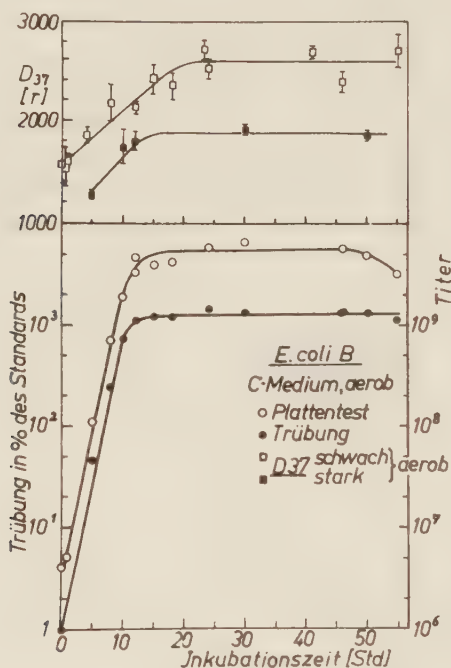


Abb. 22.

Die Trübungsmessungen stammen von verschiedenen Versuchen, sie reihen sich sehr schön alle auf ein und derselben Kurve ein. Weiter erkennt man wiederum die Parallelität von Trübung und Bakterienzahl. Auch beim Übergang zur stationären Phase ändert sich der Proportionalitätsfaktor nicht allzusehr. Da bei der Trübungsmessung im wesentlichen die Gesamtmasse der Bakterien bestimmt wird, bedeutet das, daß sich unter diesen Kulturbedingungen die Bakterien der Wachstums- und der stationären Phase in ihrer Größe nicht sehr unterscheiden, und daß sich beim Übergang zur stationären Phase nur ein Teil der Bakterien ohne Größenzunahme noch einmal teilt.

Nach etwa 50 Stunden beginnt die Kultur zu altern und die Zahl der lebensfähigen Bakterien sinkt ab.

Nun zur D_{37} . Die Werte für die normal entnommenen und die vor der Bestrahlung zusätzlich belüfteten Bakterien liegen deutlich getrennt und zeigen so den Einfluß des Sauerstoffs. Im übrigen zeigen beide Kurven im wesentlichen das gleiche Verhalten: die D_{37} steigt während der exponentiellen Wachstumsphase an und erreicht in der stationären Wachstumsphase einen konstanten Wert, der sich bei den "schwach aerob" bestrahlten Bakterien später einstellt als bei den "stark aerob" bestrahlten. Sie zeigt somit einen völlig anderen Verlauf als die von Stapleton veröffentlichte Kurve, die während der exponentiellen Wachstumsphase absinkt und erst beim Übergang zur stationären Phase wieder ansteigt. Das braucht aber kein Widerspruch zu sein, da er ja einen anderen Bakterienstamm und andere Kulturbedingungen verwendet.

Für jeden einzelnen Punkt auf den beiden Kurven wurde eine ganze Dosiseffektkurve mit 5 Meßpunkten aufgenommen. Die Steigung der Geraden in halblogarithmischer Darstellung und damit die D_{37} wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet, ebenso die Fehlerbreite für die D_{37} . Formeln dafür findet man z.B. bei Wallis und Roberts (114).

Auffallend ist ein praktisch sofortiges Absinken der D_{37} , so wie die Bakterien in das neue Nährmedium gebracht werden. Die Messung ging so vor sich, daß 2 ml Stammkultur in 200 ml grünes schon seit einigen Minuten belüftetes Nährmedium von 37°C überpipettiert wurden; die Bakterien wurden durch kurzes Schwenken des Kolbens gleichmäßig verteilt und unmittelbar darauf wurde die zur Bestrahlung bestimmte Probe entnommen und auf 0°C gebracht. Zwischen Einimpfen und Entnahme vergingen nicht mehr als 2 - 3 Minuten. Allerdings stand die Probe bis zur Bestrahlung dann noch etwa $1/2$ bis 1 Stunde bei 0°C , so daß zwar keine Stoffwechselvorgänge möglich waren, aber doch ein Austausch zwischen Zelle und Medium durch Diffusion stattfinden konnte.

Beim Einimpfen aus einer anaeroben Stammkultur sank die D_{37} von 2100 ± 100 r auf 1600 ± 200 r. Auch beim Einimpfen aus einer aeroben Stammkultur sank die D_{37} ab, und zwar von 2600 ± 100 r auf 1900 ± 100 r. Nach weiteren 41 Stunden Bebrütung stieg sie wieder auf 2700 ± 200 r an. Aus derselben Stammkultur wurde auch eine Probe in C-Medium ohne Glucose geimpft; auch hier sank die D_{37} auf 2100 ± 200 r. Nach 41 Std. war sie hier konstant geblieben, nämlich 2000 ± 100 r.

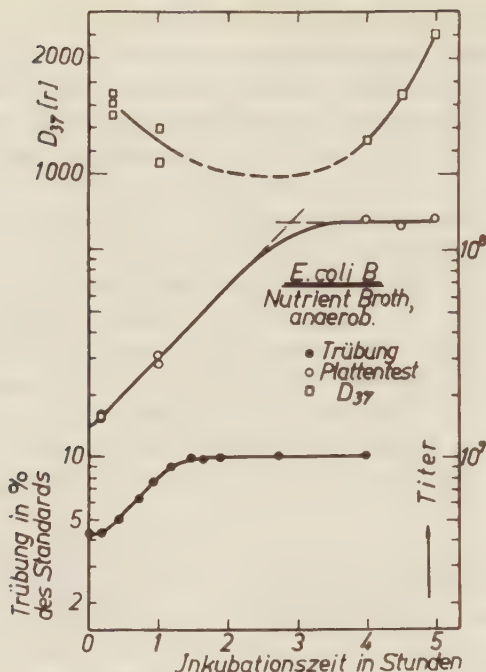


Abb. 23.

Ein weiterer Vergleich zwischen D_{37} und wachstumsstadium, wenn auch nicht so ausführlich, wurde mit Bakterien durchgeführt, die in Nutrient Broth praktisch anaerob gewachsen waren (Abb. 23). In diesem Fall wurde 1 ml Stammsuspension in 10 ml frische Nutrient Broth von 37° C im Reagenzglas gegeben; zur Trübungsmessung konnte das Reagenzglas in das Eppendorfergerät eingeführt werden.

Hier ist jedoch die Trübung keineswegs als Maß für den Wachstumszustand zu gebrauchen; wenn die maximale Trübung erreicht ist, vermehrt sich die Zahl der Bakterien noch um einen Faktor 4, d.h. sie sind in der stationären Phase viel kleiner als im Wachstumszustand.

Die Abhängigkeit der D_{37} vom Kulturalter ist hier eine ganz andere wie bei den aerob in O-Medium gewachsenen Bakterien; sieht man von dem Anstieg während der lag-Phase ab, der hier wegen der Kürze der lag-Phase nicht erfaßt wurde, so verläuft

sie qualitativ so wie bei Stapleton. Ein quantitativer Vergleich ist nicht möglich, da Stapleton einen Bakterienstamm mit anderer Strahlenempfindlichkeit verwendete und auch nicht die D_{37} angab, sondern die Überlebensrate bei 30000 r. Zwar zeigt die Überlebensrate bei einer bestimmten Dosis denselben Gang wie die D_{37} , doch läßt sich der Effekt beliebig groß machen, wenn man nur die Dosis entsprechend groß wählt.

Messungen der D_{37} bei genau definiertem höherem Kulturalter wurden in Nutrient Broth nicht gemacht, doch liegt eine ganze Reihe von Werten vor, aus denen sich der Gang der D_{37} mit dem Titer entnehmen läßt (Tab. 1). Bei anaerobem Wachstum in Nutrient Broth wurde beobachtet, daß sich in der stationären Phase kein wirklich konstanter Wert der Bakterienzahl einstellt, sondern daß diese noch langsam ansteigt. Das dürfte mit der Tatsache zusammenhängen, daß unter diesen Kulturbedingungen das Nährmedium nur zu etwa 1/10 aufgebraucht wird (Abschnitt 3). Es ist also wohl zulässig, anzunehmen, daß das "wahre" Kulturalter um so höher war, je höher der Titer war.

<i>E.coli B, Nutrient Broth, anaerob.</i>		
<i>KULTURALTER IN STUNDEN</i>	<i>Titer</i>	<i>D_{37} [r]</i>
20	$3,08 \cdot 10^8$	1100
20	256 .	1300
18	174 .	1900
18	161 .	1800
20	149 .	2000
20	133 .	2200
20	177 .	2500
18	158 .	2800
20	145 .	2500
18	114 .	3000

Tabelle 1.

Zunächst sieht man, daß das "formale" Kulturalter und die Höhe des Titers nichts miteinander zu tun haben, eben weil beim Einimpfen mit der Platinöse eine wechselnde Anzahl von Bakterien

übertragen wurde und die Kulturen sich deshalb in ihrem "wahren" Alter unterschieden.

Weiter stellt man fest, daß sich die Werte in zwei Gruppen ordnen lassen. In beiden Gruppen besteht die Tendenz, daß die D_{37} um so größer ist, je niedriger der Titer ist, in der zweiten Gruppe vielleicht nicht so ausgeprägt. Die Werte für die D_{37} liegen in der zweiten Gruppe sehr viel höher als in der ersten.

Der Grund für diese Ergebnisse liegt in der angewendeten Versuchstechnik: Die Bakterien in der stationären Phase setzten sich z.T. auf dem Boden des Reagenzglases ab. Daher wurde vor der Entnahme zur Bestrahlung kurz Luft durchgeblasen, um die Zellen aufzuwirbeln und gleichmäßig in der Flüssigkeit zu verteilen. Die Bakterien waren also anaerob gewachsen, aber aerob bestrahlt. Dieses Verfahren lieferte die Werte der ersten Gruppe. In einigen Fällen wurde keine Luft durchgeblasen, sondern die Bakterien wurden nur mit der Pipette aufgerührt. Dies ergab die Werte der zweiten Gruppe. Es handelt sich also bei dem Unterschied zwischen den beiden Gruppen um einen Sauerstoffeffekt.

Dazu kommt die Abhängigkeit der D_{37} vom Kulturalter, das hier indirekt durch die Höhe des Titers gegeben ist. Falls diese Annahme richtig ist, werden die Bakterien also mit zunehmendem Kulturalter wieder strahlenempfindlicher, im Gegensatz zu ihrem Verhalten in der aeroben Kultur in C-Medium. Stapleton konnte einen solchen Effekt nicht finden, da er nur wenige Stunden über den Beginn der stationären Phase hinaus gemessen hat. Außerdem waren seine Kulturen aerob gewachsen.

Bei anaerob in Bacto-Tryptone und C-Medium gewachsenen Bakterien wurde dasselbe Ergebnis gefunden, auch hier nahm die D_{37} mit höher werdendem Titer ab (Tab. 2 und 3).

Houtermans (59) hatte an synchron auf Agar wachsenden Kulturen von E. coli HIG festgestellt, daß ihre Empfindlichkeit gegen α -Strahlen und UV vom Wachstumszustand der Einzelbakterien, also etwa der seit der letzten Teilung verflossenen Zeit, abhing. Sie war kurz vor der Teilung am größten, kurz nach der Teilung am kleinsten. Es erhob sich die Frage, ob die Änderungen der D_{37} etwa darauf zurückzuführen sind, daß in der Wachstumsphase eine Mischpopulation von verschiedenen empfindlichen Bakterien vorliegt, deren Anteile sich im Laufe der Kultur ändern. Eine Mischpopulation erkennt man daran, daß bei höheren Dosen die Dosiseffektkurve flacher wird. Allerdings macht sich eine

<i>E.coli B</i> in Bacto-Tryptone	
<i>Titer</i>	$D_{37}[r]$
$10 \cdot 10^8$	1200
$8,3 \cdot 10^7$	1700
$70 \cdot 10^7$	2000

Tabelle 2.

<i>E.coli B</i> , C-Medium, anaerob.		
KULTURALTER IN STUNDEN	<i>Titer</i>	$D_{37}[r]$
18	$9,7 \cdot 10^8$	1900
24	78 .	1800
20	77 .	1900
20	63 .	2300
18	61 .	3000
20	55 .	3000
20	53 .	3600

Tabelle 3.

solche Abflachung erst unterhalb einer Überlebensrate von 10 % bemerkbar. Bei einer Bestrahlung von aerob in C-Medium gewachsenen Bakterien mit höheren Dosen konnte jedoch weder in der exponentiellen Wachstumsphase noch im Übergangsgebiet zur stationären Phase eine solche Abflachung bemerkt werden, die Dosis-effektkurve verlief exponentiell bis zu einer Überlebensrate von weniger als 1 % (Abb. 24 und 25). Somit dürfte eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Einzelbakterien in der Kultur unter diesen Versuchsbedingungen nur von geringer Bedeutung sein.

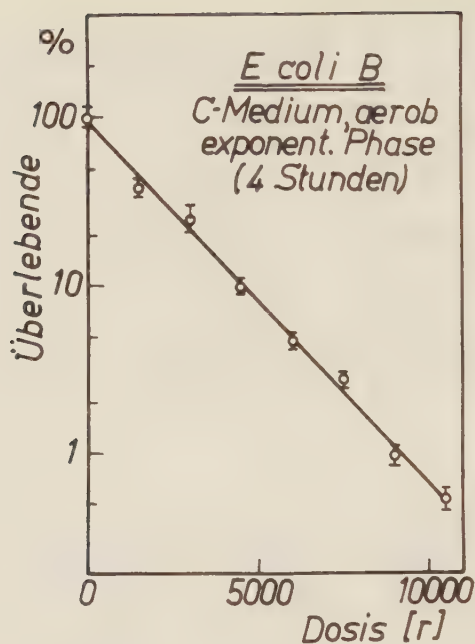


Abb. 24.

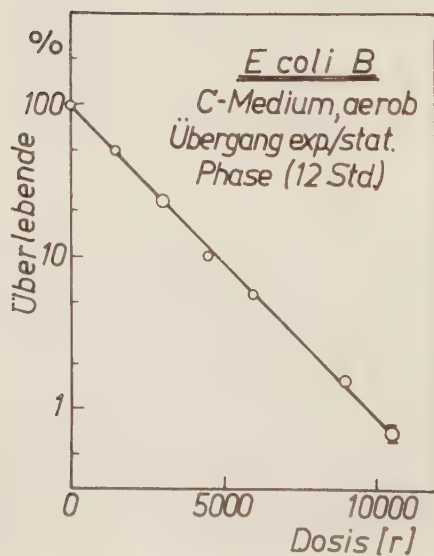


Abb. 25.

3) Wachstum in flüssigem Nährmedium nach der Bestrahlung.

a) lag-Phase und Verdopplungszeit.

Die Dauer der lag-Phase t_1 und die Verdopplungszeit t_2 bei 37°C wurden in Nutrient Broth (ohne Belüftung) und in C-Medium (mit Belüftung) durch Trübungsmessungen bestimmt. Außerdem wurden zur Kontrolle einige Plattentests ausgeführt.

Die Werte waren abhängig vom Zustand der Vorkultur, dem Grad der Verdünnung und selbstverständlich vom Nährmedium.

Es wurden folgende Ergebnisse gefunden:

Nutrient Broth, 1 : 10 verdünnt

Dosis:	0	600	2400	r
t_1 :	15	30	20	min
t_2 :	25	35	30	"

Nutrient Broth, 1 : 100 verdünnt

t_1 :	30	40	40	"
t_2 :	22	14	18	"

C-Medium, "alte" Bakterien gewaschen bestrahlt, 1 : 70 verdünnt

t_1 :	60	60	90	"
t_2 :	35	35	45	"

C-Medium, "neue" Bakterien gewaschen bestrahlt, 1 : 70 verdünnt

t_1 :	60	60	80	"
t_2 :	45	45	45	"

C-Medium, "alte" Bakterien nicht gewaschen bestrahlt, 1:70 verd.

Dosis:	0	60	600	2400	r
t_1 :	40	50	55	55	min
t_2 :	45	45	45	45	"

Es wurde jeweils 1 ml einer Vorkultur bestrahlt und dann mit der angegebenen Menge frischem Nährmedium verdünnt und bei 37°C bebrütet. Die Vorkultur für die "alten" Bakterien wurde aus einer alten Kultur in C-Medium beimpft, für die "neuen" von einer Schrägagarkultur.

Ein Vergleich zwischen Trübungsmessung und Plattentest zeigte, daß die Verdopplungszeit in beiden Fällen gleich war, während die lag-Phase beim Plattentest etwas länger gemessen wurde. Es ist dies auch verständlich, da während der lag-Phase die Bakterien an Masse zunehmen, bevor sie sich zum ersten Mal teilen.

C-Medium, unbestrahlte Bakterien, 1 : 100 verdünnt

	Trübung	Plattentest
t_1 :	65	80 min
t_2 :	40	40 "

Die Ungenauigkeit in der Bestimmung von t_1 und t_2 war ungefähr ± 5 min. Bei der Messung der lag-Phase rührte diese Ungenauigkeit von der in diesem Bereich sehr geringen Trübung der Bakteriensuspension her, die in derselben Größenordnung lag wie die Grundtrübung des Mediums und daher nicht sehr genau zu messen war. Die Bestimmung der Verdopplungszeit wurde dadurch erschwert, daß die Wachstumskurven nicht immer exponentiell verliefen, sondern bei der Annäherung an die stationäre Phase allmählich flacher wurden. Besonders in Nutrient Broth waren die Kurven ziemlich unregelmäßig.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei den bestrahlten Bakterien die lag-Phase etwas verlängert ist, während die Verdopplungszeit bis 2400 r praktisch die gleiche ist wie bei den unbestrahlten. Das letztere Ergebnis läßt sich in natürlicher Weise so verstehen, daß die voll wachstumsfähigen Bakterien sich in normaler Weise vermehren, während die inaktivierten keinen Beitrag liefern. Die Verlängerung der lag-Phase kann man sich wenigstens zum Teil als nur scheinbar erklären. Da die Trübung bei bestrahlten und unbestrahlten Bakterien zunächst praktisch die gleiche ist, obwohl bei den bestrahlten die Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien herabgesetzt ist, so wird hier die Trübung zuerst nur ganz geringfügig zunehmen, wenn auch die Vermehrung schon wieder voll in Gang gekommen ist. Zum Teil jedoch dürfte es sich auch um einen Einfluß der Strahlen auf die vermehrungsfähigen Bakterien handeln. Das Ergebnis bei der Bestrahlung mit 60 r scheint anzudeuten, daß selbst diese geringe Dosis einen Einfluß auf die Dauer der lag-Phase hat; die Zahl der Überlebenden beträgt hier etwa 95 %. Eine eindeutige

Antwort auf diese Frage läßt sich jedoch im Rahmen der erreichten Meßgenauigkeit nicht geben. Zur Erzielung einer höheren Genauigkeit wäre es nötig, nicht nur die Tribungsmessung, sondern auch in kurzen Zeitabständen, etwa 10 min, jeweils einen Plattentest durchzuführen. Das würde jedoch zu einem sehr großen Aufwand an Arbeit und Material führen.

b) Endkonzentration der Bakterien.

Außer der Dauer der lag-Phase und der Verdopplungszeit wurde auch untersucht, welchen Endtiter die Bakterien bei Wachstum in flüssigem Nährmedium erreichen. Die Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien pro ml wurde durch Ausplatten einer Probe in gewissen Zeitabständen untersucht. Als Nährmedium diente zunächst normal konzentrierte Nutrient Broth. Es wurden jeweils 2 ml Bakterien-suspension aus einer Vorkultur in Nutrient Broth aus der stationären Phase mit 0, 600 und 1800 r bestrahlt und dann in 20 ml Nutrient Broth von 37° C gegeben.

Bei den unbestrahlten Bakterien stieg der Titer nach Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase noch langsam an, erreichte nach 30 - 40 Stunden ein flaches Maximum und sank dann langsam wieder ab. Die bestrahlten Bakterien zeigten ein sehr unregelmäßiges Verhalten; ihre Zahl war im Laufe der Zeit bald niedriger, bald höher als die der unbestrahlten. Im Mittel kann man sagen, daß innerhalb der Schwankungsbreite der Endtiter bei bestrahlten und unbestrahlten Bakterien gleich war, vielleicht bei den bestrahlten etwas niedriger; doch waren bei den bestrahlten die Schwankungen sehr viel größer als bei den unbestrahlten. Dasselbe Ergebnis wurde auch erzielt, wenn die Bakterien in Nutrient Broth georacht wurden, die mit derselben Dosis bestrahlt war wie die Bakterien-suspension.

Es stellte sich heraus, daß bei normal konzentrierter Nutrient Broth der erreichte Endtiter der Bakterien keineswegs durch die vorhandene Nährstoffmenge bedingt ist. Verdünnt man nämlich eine Kultur aus der stationären Phase nicht mit frischer Nutrient Broth, sondern mit Phosphatpuffer, so wächst sie noch bei einer Verdünnung 1 : 10 praktisch zu derselben Endkonzentration heran. Erst bei noch stärkerer Verdünnung sinkt diese ab (Abb. 26).

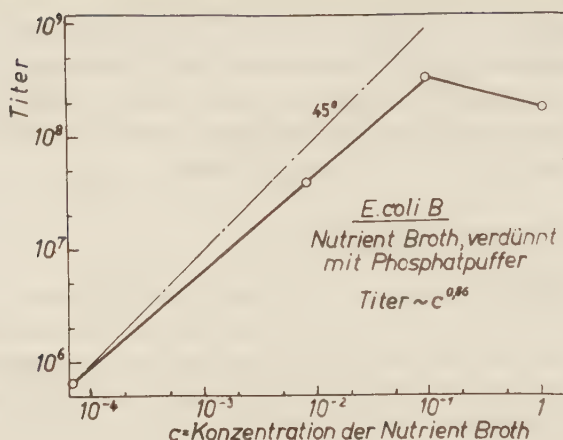


Abb. 26.

Man erzielt auch denselben Endwert, ob man nun die Bakterien mit der gebrauchten Nutrient Broth sofort in Puffer verdünnt oder ob man sie erst azentrigugliert, mit frischer Nutrient Broth auffüllt und dann erst mit Phosphatpuffer verdünnt (Abb. 27). Der einzige Unterschied ist, daß mit frischer Nutrient Broth die Wachstumskurve zunächst etwas steiler ansteigt (Abb. 27 a).

In dieser mit Puffer verdünnten Nutrient Broth zeigen nun bestrahlte und unbestrahlte Bakterien ein deutlich verschiedenes Verhalten (Abb. 28).

Man kann folgende Bezeichnungen einführen:

- A_0 = Gesamtzahl der Bakterien pro ml Ausgangssuspension
 A = Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien pro ml "
 $a = \frac{A_0 - A}{A_0}$ = Anteil der strahlengetöteten Bakterien/ml "
 E_0 = erreichter Endtiter bei den unbestrahlten Bakterien
 E = " " " " bestrahlten "

Da die Verdünnung jedesmal die gleiche war, ist a natürlich auch proportional zur Zahl der strahlengetöteten Bakterien pro ml verdünntem Medium.

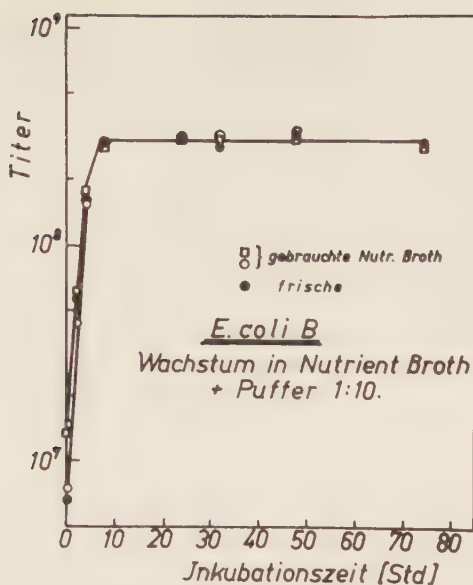


Abb. 27.

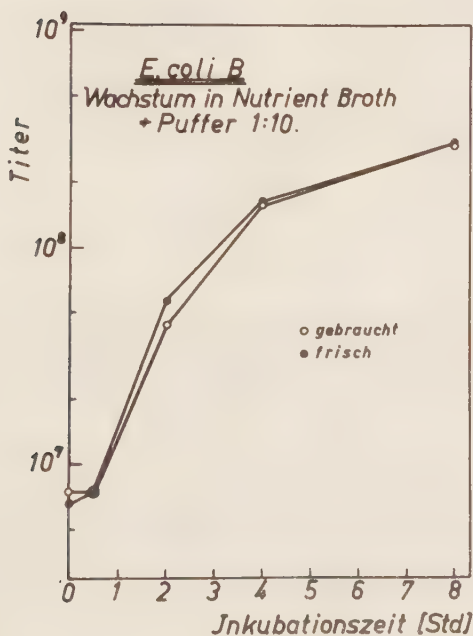


Abb. 27a.

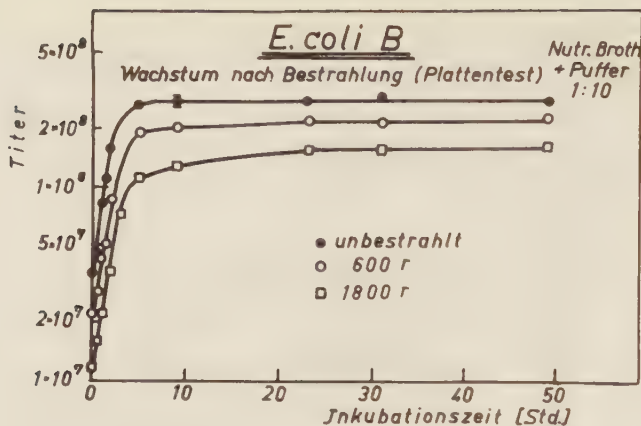


Abb. 28.

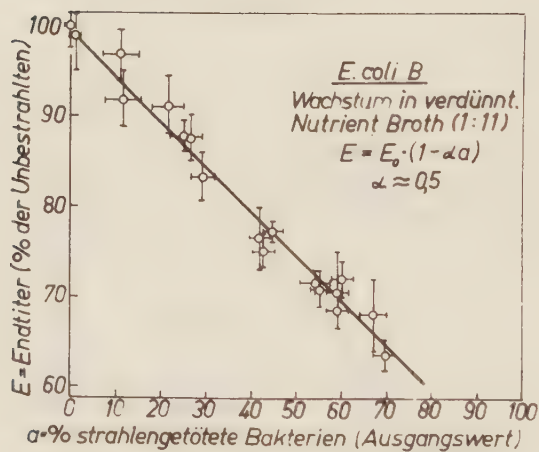


Abb. 29.

Trägt man E in Abhängigkeit von a auf, so findet man einen linearen Zusammenhang bis zu $a = 70\%$ (Abb. 29). Bei höheren Werten von a wurde hier nicht gemessen.

Extrapoliert man die Gerade bis $a = 100\%$ (also alle Bakterien durch die Strahlung getötet), so findet man dafür $E = 50\%$. Das erscheint auf den ersten Blick sehr überraschend, bedeutet aber zunächst nur, daß ein einzelnes überlebendes Bakterium unter einer sehr großen Zahl von strahlengetöteten zu einer Kultur heranwächst, deren Endtiter halb so groß ist wie bei einer unbestrahlten Kultur, was ja ganz gut denkbar ist. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß die Kurve bei höheren Werten von a steiler abfällt. Eine Andeutung dafür findet man, wenn man die Bakteriensuspension noch stärker verdünnt (Abb. 30). Allerdings liegt hier nur eine einzige Messung vor. Zur genaueren Klärung der Frage wären weitere Untersuchungen erforderlich.

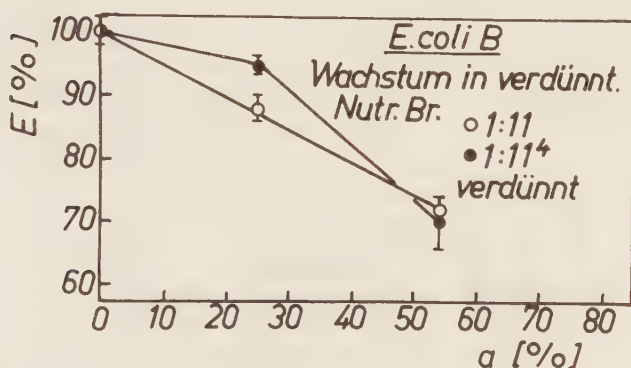


Abb. 30.

Die Abnahme des Endtiters ist offenbar vom Anteil der strahlengetöteten Bakterien abhängig und nur indirekt von der eingestrahlten Dosis. In Abhängigkeit von der Dosis zeigt E eine sehr viel größere Streuung als in Abhängigkeit von a , da bei den verschiedenen Versuchen auch verschiedenen strahlenempfindliche Kulturen verwendet wurden. (Abb. 31).

Werden den bestrahlten Bakterien unbestrahlte zugesetzt, so steigt der erreichte Endtiter, entsprechend dem veränderten Anteil der strahlengetöteten Bakterien, an (Abb. 32).

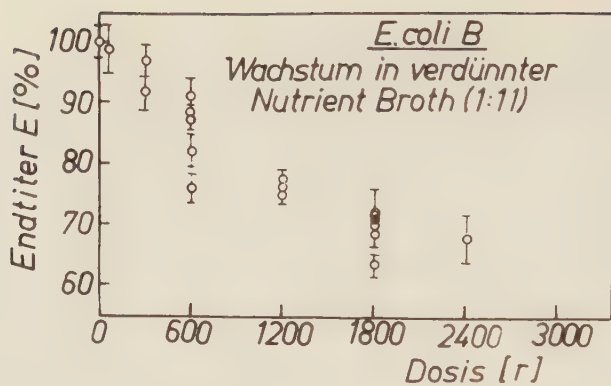


Abb. 31.

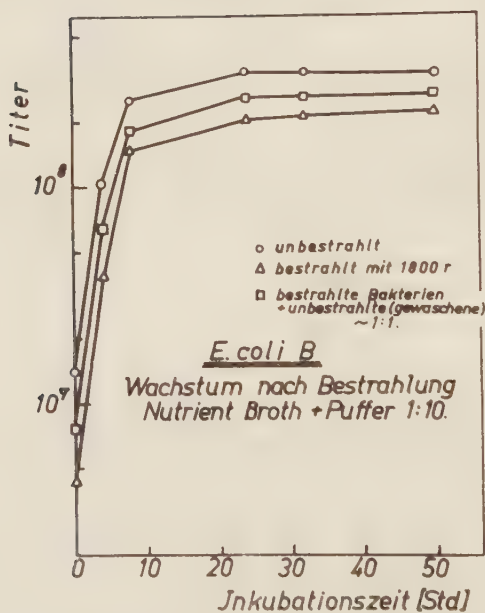


Abb. 32.

Bei allen diesen Versuchen waren die Bakterien praktisch aerob gewachsen. Die verdünnte Suspension stand in etwa 0,5 cm hoher Schicht in einem Erlenmeyerkolben, so daß recht gut Luft zutreten konnte. Einen anderen Verlauf der Wachstumskurven findet man, wenn man die Bakterien praktisch anaerob im Reagenzglas wachsen läßt (Abb. 33). Bei den praktisch aerob gewachsenen Bakterien findet man bei den bestrahlten wie bei den unbestrahlten eine exponentielle Wachstumsphase und eine stationäre Phase; der Abstand der beiden Kurven in der stationären Phase bleibt konstant. Bei den praktisch anaerob gewachsenen Bakterien dagegen findet man nur bei den unbestrahlten eine exponentielle Wachstumsphase und eine stationäre Phase, wobei der erreichte Endtiter sehr viel kleiner ist als bei den aerob gewachsenen. Bei den mit 1800 r bestrahlten, praktisch anaerob gewachsenen Bakterien beobachtet man dagegen überhaupt keine exponentielle oder stationäre Wachstumsphase, vielmehr nimmt die Bakterienzahl nahezu linear mit der Inkubationszeit zu. In halblogarithmischer Darstellung führt das zu einer allmählichen Verflachung der Wachstumskurve.

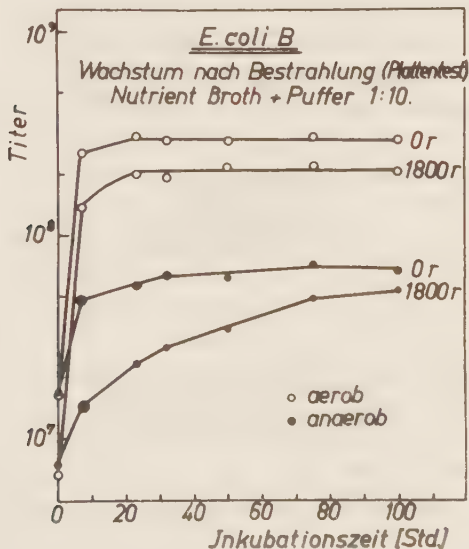


Abb. 33.

Für eine Beeinflussung des Endtiters ist es wesentlich, daß die Abtötung der Bakterien durch Strahlung erfolgte. Gibt man zu unbestrahlten Bakterien etwa durch Hitze abgetötete hinzu, so findet man keinerlei Beeinflussung des Endtiters, bzw. nur eine Beeinflussung dadurch, daß durch die zugefügten Bakterien unterschiedliche Mengen von Nährmedium in die Flüssigkeit gebracht wurden. Die Zahlen an den Kurven in Abb. 34 geben an, wieviel Nutrient Broth jeweils in die Gesamtmenge von etwa 20 ml Phosphatpuffer eingebracht wurde.

Eine ausführliche Besprechung der Ergebnisse erfolgt in der "Diskussion".

Wo in den Kurven keine Fehlergrenze eingezeichnet ist, wird diese durch die Größe der Punkte angegeben.

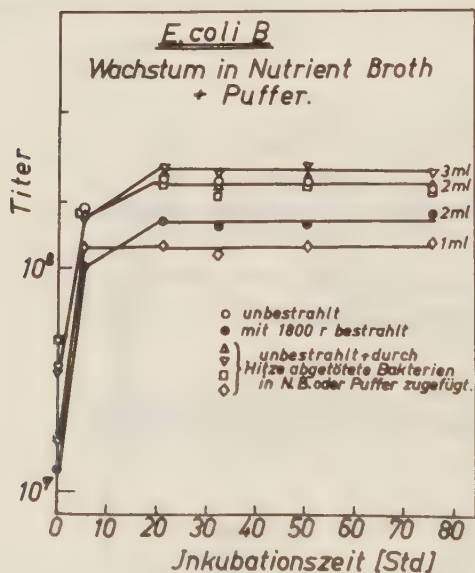


Abb. 34.

Diskussion.

=====

1) Kleinste biologisch wirksame Dosis.

Zur Frage einer kleinsten biologisch wirksamen Strahlendosis ist zunächst zu betonen, daß man keinesfalls von einer solchen schlechthin sprechen kann, sondern nur

in Bezug auf eine ganz bestimmte Strahlenwirkung

bei einem ganz bestimmten Objekt

unter ganz bestimmten Versuchsbedingungen.

So findet man, wie im Abschnitt 3) noch näher besprochen wird, eine Beeinflussung der Stoffwechselaktivität von Bakterien unmittelbar nach der Bestrahlung erst bei sehr hohen Dosen, während ihre Koloniebildungsfähigkeit schon bei viel kleineren Dosen gehemmt wird. Untersucht man als Strahlenwirkung das Überleben eines bestimmten Prozentsatzes der Organismen nach einer bestimmten Zeit, so findet man, daß je nach dem Versuchsobjekt ganz verschiedene Dosen dafür nötig sind (z.B. Rajewsky et al. (95), Tabelle B 4). Außerdem ist es bekannt, daß man bei verschiedenen Versuchsbedingungen, etwa Änderung des Sauerstoffdrucks während der Bestrahlung, Zugabe von Strahlenschutzsubstanzen, Verwendung verschieden dicht ionisierender Strahlen usw. eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der Organismen beobachtet, und falls es für den untersuchten Effekt eine "Schwellendosis" gibt, so wird man erwarten, daß diese sich ebenfalls mit den Versuchsbedingungen ändert.

Hat man ein bestimmtes Versuchsobjekt ausgewählt, so wird man, um einigermaßen sinnvoll von einer kleinsten, überhaupt biologisch wirksamen Dosis sprechen zu können, für die Untersuchung eine Strahlenwirkung auswählen, die auf möglichst kleine Dosen anspricht, und den Verlauf dieser Wirkung mit abnehmender Dosis verfolgen. Dabei kann man jedoch nie völlig sicher sein, ob es nicht noch eine andere Strahlenwirkung gibt, die auf noch kleinere Dosen anspricht, und die der Aufmerksamkeit entging. Nur wenn man bei dem untersuchten Effekt findet, daß es für ihn keine Schwellendosis gibt, kann man allgemein sagen, "bei dem betreffenden Organismus gibt es unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine kleinste biologisch wirksame Dosis". Findet man dagegen für einen untersuchten Effekt eine Schwellendosis, so kann man nur sagen, "in Bezug auf diesen Effekt gibt es eine

kleinste biologisch wirksame Dosis", wobei es offenbleiben muß, ob vielleicht für andere, nicht untersuchte Strahlenwirkungen eine solche nicht existiert.

Es ist völlig klar, daß es keine "kleinste physikalisch wirksame Dosis" ionisierender Strahlen geben kann. Keine physikalische Wirkung, also keine Erzeugung von Ionisationen, hat man nur bei der Dosis Null. Unsere Fragestellung läuft nun darauf hinaus: "Ist es möglich, durch eine einzige, an passender Stelle erzeugte Ionisation eine beobachtbare biologische Änderung in einem Organismus hervorzurufen".

Man wird also versuchen, die Wirkung einer Strahlendosis zu messen, bei der im Mittel nur eine Ionisation pro Organismus erzeugt wird. Eine kurze Abschätzung zeigt aber, daß das praktisch nicht durchführbar ist, weil die Meßgenauigkeit dabei zu gering wird.

Nimmt man an, daß zur Erzeugung eines Ionenpaares in der Zelle derselbe Energiebetrag nötig ist wie in Luft, so findet man, daß 1 r $1,6 \cdot 10^{12}$ Ionenpaare/g Gewebe erzeugt. Da die Dichte ungefähr gleich eins ist, so sind das also 1,6 I.p./ μ^3 . Ein Bakterium coli hat die Form eines Stäbchens von etwa 0,7 μ Dicke und 2-3 μ Länge, besitzt also gerade ein Volumen von etwa 1 μ^3 . Bei der kleinsten, in den vorliegenden Versuchen angewendeten Dosis, nämlich 60 r, wurden also pro Bakterium im Mittel etwa 100 Ionenpaare erzeugt. Dabei wurden, je nach den Versuchsbedingungen, 2 - 5 % der Bakterien abgetötet. Damit pro Bakterium im Mittel nur ein Ionenpaar erzeugt wird, müßte man die Dosis noch um einen Faktor 100 heruntersetzen. Bei einem genau exponentiellen Verlauf der Dosiseffektkurve würde dann auch die Zahl der strahlengetöteten Bakterien um einen Faktor 100 geringer, da die Exponentialfunktion bei derart kleinen Schädigungsraten praktisch linear verläuft. Man hätte also etwa 0,03 % strahlengetötete Bakterien zu erwarten. Um einen derart kleinen Effekt überhaupt messen zu können, müßte man die Meßgenauigkeit auf etwa 0,01 % bringen. Um aber allein den statistischen Fehler auf diesen Wert herausdrücken zu können, wäre die Zählung von 100 Millionen Kolonien pro Meßpunkt notwendig! Das ist praktisch unmöglich; ganz abgesehen davon, daß sich hier auch noch andere Fehlerquellen bemerkbar machen, z. B. Pipettierfehler, Zusammenwachsen von zwei Kolonien, ungleichmäßiges Auskeimen schon bei den unbestrahlten Bakterien, usw.

Man muß daher aus dem gesamten Verlauf der Dosiseffektkurve Schlüsse auf das Verhalten der Organismen bei sehr kleinen Dosen ziehen. Nach der Treffertheorie, welche erstmals von Dessauer (25) aufgestellt und von Blau und Altenburger (13) mathematisch ausgearbeitet wurde, sind exponentielle Dosiseffektkurven zu erwarten, wenn die Schädigung auf einen einzigen Elementarvorgang zurückzuführen ist; sind dagegen mehrere Elementarereignisse (Treffer) für das Auftreten einer Schädigung notwendig, so erhält man sigmoide Dosiseffektkurven. Als Treffer sah Dessauer die Energieabgabe in einem engbegrenzten Bereich (Punktwärme) an, Holweck (55-58) sowie Lacassagne (74-76) die Absorption eines Strahlungsquants, Glocker (34-36) den Durchgang eines Elektrons, Crowther (19-21) die Bildung eines Ionenpaares in einem strahlenempfindlichen Bereich der Zelle. Lea (78) betrachtet als Treffer die Bildung eines positiven Ions. Denn das Molekül, dem das ionisierte Atom angehört, wird sich praktisch mit Sicherheit chemisch verändern, ob nun ein Bindungselektron abgetrennt oder ein inneres Elektron herausgeworfen wurde, da die auftretenden Energien größer sind als die Bindungsenergie ($C-H : \sim 4 \text{ eV}$). Aus einem Vergleich der biologischen Wirkung von ultravioletter und ionisierender Strahlung schließt Lea, daß die Anregungen, welche die ionisierende Strahlung ebenfalls erzeugt, in ihrer Bedeutung gegenüber den Ionisationen völlig zu vernachlässigen sind, ebenso die Bildung negativer Ionen, da die mit der Anlagerung eines Elektrons verbundene Energie gewöhnlich noch kleiner ist als die Anregungsenergie. Da die Ionen nicht statistisch gleichmäßig in der Materie erzeugt werden, sondern mehr oder weniger dicht entlang der Bahn eines ionisierenden Teilchens, so folgt daraus, daß man bei dicht ionisierender Strahlung auch den Durchgang eines ionisierenden Teilchens als Treffer ansehen kann, oder auch die Absorption eines Röntgenquants, wobei ja ein Elektron ausgelöst wird. Ebenso kann man die "Punktwärme" praktisch mit der Energieabgabe bei der Ionisation gleichsetzen.

Dessauer (26,27) und Rajewsky (93) zeigten, daß die Annahme, die Ionisation müsse im empfindlichen Bereich erfolgen, zu speziell und im allgemeinen Formalismus der Treffertheorie nicht begründet ist. Es kommt nur darauf an, daß durch die Strahlung zeitlich und räumlich diskontinuierlich und statistisch verteilt Energiedepots gesetzt werden; durch Diffusion von Energieträgern kann diese Energie anschließend an eine empfindliche Stelle des

biologischen Objekts transportiert werden. Diese "indirekte Strahlenwirkung" wurde besonders bei der Bestrahlung von verschieden stark verdünnten Enzymlösungen beobachtet, auch bei Bestrahlung von biologischen Objekten bei tiefer Temperatur oder in trockenem Zustand, also unter Bedingungen, die eine Diffusion von Energieträgern erschweren oder unmöglich machen. (Barron (9), Dale, Gray and Meredith (24), Dale (23), Pauly und Rajewsky (90), Rajewsky (94), Six (104), Weiss (116)).

Weiterhin zeigte Rajewsky (93), daß die strahlenempfindliche Substanz nicht an einer Stelle der Zelle konzentriert zu sein braucht, sondern daß sie über die ganze Zelle verteilt sein kann.

Berücksichtigt man, daß sowohl durch Ionisationen als auch durch reaktionsfähige Bestrahlungsprodukte chemische Änderungen an anderen Molekülen hervorgerufen werden, so kann man folgende Definition machen:

Unter einem Treffer verstehen wir die chemische Änderung eines lebenswichtigen Makromoleküls, entweder durch eine Ionisation (direkter Treffer) oder durch Reaktion mit Bestrahlungsprodukten aus der Umgebung (indirekter Treffer). Der "Treffbereich" ist dann die Summe dieser Makromoleküle oder Unterbereiche. Auch beim Vorliegen eines Eintreffervorgangs können es mehrere sein, vorausgesetzt, daß die Schädigung eines einzigen davon genügt, um den untersuchten Effekt, hier also die Abtötung, hervorzubringen. Als "Dosis" darf man nur dann die in üblicher Weise gemessene Dosis einsetzen, wenn keine indirekte Strahlenwirkung vorliegt, sonst muß eine "wirksame Dosis" eingesetzt werden, bei der auch die reaktionsfähigen Bestrahlungsprodukte berücksichtigt sind.

Diese Art der Definition von Treffer und Treffbereich unterscheidet sich von der allgemein üblichen Art, bei der ein "formaler Treffbereich" eingeführt wird, dessen Größe dann von den Versuchsbedingungen abhängig ist. Dagegen wird hier ein "wahrer Treffbereich" eingeführt, während die "wirksame Dosis" von den Versuchsbedingungen abhängt. Diese Definition ist für praktische Messungen vielleicht nicht so günstig, da über die Größe der "wirksamen Dosis" zunächst nichts bekannt ist, doch scheint sie recht geeignet zum Verständnis der Vorgänge bei der Bestrahlung.

Einen Eintreffervorgang hat man also dann, wenn die Änderung eines einzigen biologisch wichtigen Moleküls durch einen einzigen Elementarvorgang für das Auftreten des untersuchten Effekts

genügt; dabei ist es gleichgültig, ob es sich um die Ionisation des betreffenden Moleküls handelt oder um die Reaktion mit einem Bestrahlungsprodukt, etwa einem Radikal oder einem H_2O_2 -Molekül. Denn letzten Endes ist sowohl die Ionisation wie auch die Bildung des Bestrahlungsprodukts auf einen einzigen Energieabgabevorgang zurückzuführen.

Der mathematische Formalismus ist genau derselbe, ob man mit einem "formalen Treffbereich" oder mit einer "wirksamen Dosis" rechnet. Denn schreibt man für den Eintreffervorgang

$$N/N_0 = e^{-V\alpha D}$$

wobei V der wahre Treffbereich und D die Dosis sei, so ist es gleichgültig, ob man $V\alpha$ als "formalen Treffbereich" oder $\alpha \cdot D$ als "wirksame Dosis" zusammenfaßt. Auch in den Mehrtrefferformeln tritt immer der gesamte Ausdruck $V\alpha D$ auf. Nur zur Vereinfachung der Schreibweise soll in den folgenden Rechnungen $V\alpha D = \lambda D$ gesetzt werden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde gefunden, daß die Dosiseffektkurve von 10000 r bis herunter zu 60 r exponentiell verläuft. Es erhebt sich nun die Frage, ob daraus notwendigerweise folgt, daß es sich um einen Eintreffervorgang handelt, oder ob es möglich ist, daß der Kurvenverlauf durch ein heterogenes Objektgemisch und Mehrtreffervorgänge hervorgerufen wurde.

Nimmt man an, daß die Dosiseffektkurve nur durch die Empfindlichkeitsverteilung der Bakterien bedingt ist, also daß alle gleich empfindlichen Bakterien nach der gleichen Dosis inaktiviert werden, so findet man die Empfindlichkeitsverteilung der Bakterien durch Differentiation der Inaktivierungskurve (Houtermans (60)). Damit man eine exponentielle Dosiseffektkurve erhält, müßte also die Empfindlichkeitsverteilung ebenfalls exponentiell verlaufen. Dabei hat man jedoch für $D = 0$ einen endlichen Wert, was äquivalent ist mit dem Auftreten unendlich großer Treffbereiche und bei Objekten endlicher Größe nicht sehr sinnvoll ist. Schließt man unendlich große Treffbereiche aus, so muß die Empfindlichkeitsverteilung für $D = 0$ nach Null gehen. Daraus folgt dann, daß die Dosiseffektkurve eine wagrechte Anfangstangente haben müßte. In den vorliegenden Untersuchungen konnte aber keinerlei Andeutung für eine solche gefunden werden.

Hall (44) untersuchte die Frage, ob sich Gemische von Objekten angeben lassen, welche Treffbereiche von einheitlicher Größe besitzen, aber unterschiedliche Trefferzahlen für die Inakti-

vierung benötigen, so daß insgesamt eine exponentielle Dosis-effektkurve resultiert. Er zeigt, daß das tatsächlich möglich ist. Die Häufigkeit der Komponenten nimmt exponentiell mit der Trefferzahl ab. Bezeichnet man mit β_1 den Anteil der Organismen, welche durch einen Treffer inaktiviert werden, so findet man für den Anteil, welcher n Treffer benötigt,

$$\beta_n = \beta_1 (1 - \beta_1)^{n-1}$$

Die Häufigkeitsverteilung ist also sehr speziell, nur ein einziger Parameter ist frei, nämlich β_1 . Im Prinzip könnte zwar β_1 beliebig klein sein, etwa 0,1 oder 0,01; doch bleiben in diesem Fall die β_n bis zu ziemlich hohen Trefferzahlen in derselben Größenordnung und nehmen um so langsamer ab, je kleiner β_1 ist. Wird durch eine Änderung der Versuchsbedingungen β_1 geändert, so müssen sich also auch sämtliche übrigen β_n ändern, und zwar in genau der Weise, daß wieder die richtige Häufigkeitsverteilung entsteht. Daß das eintritt, wenn sehr viele β_n zu berücksichtigen sind, ist äußerst unwahrscheinlich. Daß bei Bakterien aus den verschiedenen Nährmedien und in verschiedenem Kulturalter immer exponentielle Dosis-effektkurven gefunden wurden, spricht also dafür, daß jedenfalls β_1 nicht besonders klein war.

Etwas anderes ist es, wenn $\beta_1 > 0,8$ und praktisch alle übrigen Organismen in der Population zwei Treffer zur Inaktivierung benötigen. Der Anteil der Organismen, welche drei oder mehr Treffer brauchen, ist dann nach der Theorie kleiner als 4 %, und innerhalb der experimentellen Genauigkeit ist sein Einfluß zu vernachlässigen. Es läßt sich also auch beim Vorliegen einer exakt exponentiellen Dosis-effektkurve nicht ausschließen, daß nur etwa 80 % der Organismen durch einen einzigen Treffer inaktiviert werden. Doch interessiert man sich bei der Frage nach einer kleinsten biologisch wirksamen Dosis hauptsächlich für das Verhalten der überwiegenden Mehrheit einer bestrahlten Population und weniger dafür, ob vielleicht ein gewisser Prozentsatz von resistenteren Organismen beigemischt ist.

Dittrich (28) zeigte, daß man auch eine exponentielle Dosis-effektkurve erhalten kann, wenn man annimmt, daß alle Organismen dieselbe Trefferzahl $n > 1$ benötigen, sich aber in der Größe ihrer Treffbereiche unterscheiden. Doch muß man dabei voraussetzen, daß beliebig große Treffbereiche vorkommen. Läßt man nur Treffbereiche bis zu einer bestimmten Größe zu, so zeigt die Mischkurve bei kleinen Dosen einen abgeflachten Verlauf. Dittrich

gibt ein "Quasi-Exponentialgemisch" aus Zweitrefferkurven an, wobei die Größe der Treffbereiche bis zu einem Faktor 8 variiert wird. Dabei treten im Bereich von 70 - 90 % Überlebenden Abweichungen von der Linearität bis mehr als 5 % auf, die ~~bis~~ der erzielten Genauigkeit mit Sicherheit hätten nachgewiesen werden müssen. Bei mehr als zwei Treffern wären die Abweichungen von der Linearität noch größer, ebenso bei einer geringeren Variation der Treffbereiche. Andererseits stellt man bei der mikroskopischen Beobachtung fest, daß sich die Bakterien einer Population in ihrer Größe sicher nicht mehr als um einen Faktor 8 unterscheiden, so daß die Annahme berechtigt erscheint, daß ihre Treffbereiche auch nicht um einen wesentlich größeren Faktor verschieden sind. Somit dürfte auch diese Möglichkeit der Vortäuschung einer Eintrefferkurve durch Mehrtrefferobjekte auszuschließen sein.

Sowohl Hall als auch Dittrich geht von der Annahme aus, daß jeder Organismus einen einzigen Treffbereich besitzt, in welchem n Treffer erfolgen müssen, damit der untersuchte Effekt hervorgerufen wird. Dabei wird dann entweder die Trefferzahl n oder die Größe des Treffbereichs variiert.

Außer diesen klassischen Mehrtrefferkurven, welche schon von Chau und Altenburger (13) aufgestellt wurden, ist jedoch auch der Fall des unterteilten Treffbereichs (Timoffeff-Ressovsky und Zimmer (113)) zu untersuchen, wobei z.B. n Teilbereiche je einen Treffer erhalten müssen. Geht man von dem Bild aus, daß ein Treffer die Änderung eines biologisch wichtigen Moleküls darstellt, so erscheinen diese modifizierten Mehrtrefferkurven sogar bedeutungsvoller als die klassischen. Denn wenn zur Schädigung eines Organismus n lebenswichtige Moleküle verändert werden müssen, so muß ja jedes einzelne von ihnen getroffen sein. Erhalten nur die n Moleküle insgesamt n Treffer, so kann ein Teil von ihnen mehrfach getroffen werden, während andere völlig ungeschädigt bleiben.

Es ist auch möglich und sogar wahrscheinlich, daß Organismen, welche eine unterschiedliche Trefferzahl zur Abtötung benötigen, auch einen unterschiedlich großen Treffbereich besitzen.

Weiter ist der Fall zu berücksichtigen, daß innerhalb eines einzigen Organismus verschiedene Systeme vorhanden sind, die sich durch die Größe ihres Treffbereichs und die Trefferzahl, die zu ihrer Zerstörung benötigt wird, unterscheiden. Der

Organismus soll inaktiviert werden, wenn eines dieser Systeme zerstört ist. Z.B. ist eine Letalmutation durch ionisierende Strahlung bei einem haploiden Organismus sicher ein Eintreffer=vorgang: es genügt die Änderung eines einzigen Nukleinsäuremoleküls. Derselbe Organismus könnte aber auch dadurch abgetötet werden, daß eine gewisse, größere Zahl von Eiweißmolekülen durch die Strahlung zerstört wird, ohne daß ein Nukleinsäuremolekül getroffen ist.

Es sollen nun folgende Fälle untersucht werden:

- 1) Mischpopulation aus Objekten mit unterschiedlicher Trefferzahl und unterschiedlich großem, einfachem Treffbereich; der Bruchteil der Objekte, welche n Treffer zur Abtötung erfordern, sei β_n und $\sum_{n=1}^{\infty} \beta_n = 1$. Für die Dosiseffektkurve gilt:

$$N/N_0 = \sum_{n=1}^{\infty} \left\{ \beta_n e^{-\lambda_n \cdot D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_n D)^k}{k!} \right\}$$

- 2) Mischpopulation aus Objekten mit einer variablen Zahl von Unterbereichen, von denen jeder je einmal getroffen werden muß. Die Unterbereiche können sich in ihrer Größe unterscheiden. Es ist hier

$$N/N_0 = \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n \left\{ 1 - (1 - e^{-\lambda_n D})^n \right\}$$

- 3) Einheitliche Population von Organismen, welche in ihrem Innern verschiedene strahlenempfindliche Systeme enthalten, die sich durch Trefferzahl und Größe des Treffbereichs unterscheiden. Der Treffbereich sei jeweils einfach, und die Zerstörung eines einzigen Systems führe zur Inaktivierung des Organismus. Man findet

$$N/N_0 = \prod_{n=1}^{\infty} \left\{ e^{-\lambda_n D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_n D)^k}{k!} \right\}$$

- 4) Dasselbe wie 3), aber mit unterteilten Treffbereichen, wobei jeder Unterbereich eines Systems je einmal getroffen werden muß. Dabei ist

$$N/N_0 = \prod_{n=1}^{\infty} \left\{ 1 - (1 - e^{-\lambda_n D})^n \right\}$$

Bei Fall 3) und 4) bedeutet $\lambda_v = 0$, daß in dem Organismus kein System vorkommt, das v Treffer zur Zerstörung benötigt, der entsprechende Faktor in dem unendlichen Produkt ist dann gleich eins und liefert keinen Beitrag.

Fall 1):
$$N/N_0 = \sum_{n=1}^{\infty} \left\{ \beta_n e^{-\lambda D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda D)^k}{k!} \right\}$$

a) In dem Sonderfall, daß alle $\lambda_n = \lambda$, findet man sofort, wenn man nach Potenzen von (λD) ordnet:

$$\begin{aligned} N/N_0 &= e^{-\lambda D} \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda D)^k}{k!} = \\ &= e^{-\lambda D} \left\{ \sum_{k=1}^{\infty} \beta_n + (\lambda D) \sum_{n=2}^{\infty} \beta_n + \frac{(\lambda D)^2}{2!} \sum_{n=3}^{\infty} \beta_n + \dots \right\} \end{aligned}$$

Es ist $\sum_{n=1}^{\infty} \beta_n = 1$ und $\sum_{n=2}^{\infty} \beta_n = (1 - \beta_1)$

Der Klammerausdruck stellt eine Exponentialfunktion mit dem positiven Exponenten $(1 - \beta_1) \lambda D$ dar, wenn sich die β_n so bestimmen lassen, daß

$$\sum_{n=k+1}^{\infty} \beta_n = 1 - \sum_{n=1}^k \beta_n = (1 - \beta_1)^k$$

Aus dieser Bedingung folgt

$$\beta_n = \beta_1 (1 - \beta_1)^{n-1}$$

wie sich durch vollständige Induktion beweisen läßt. Für alle Werte $0 < \beta_1 \leq 1$ ist $\sum_{n=1}^{\infty} \beta_n = \beta_1 \sum_{n=1}^{\infty} (1 - \beta_1)^{n-1} = \frac{\beta_1}{1 - (1 - \beta_1)} = 1$

Dieselbe exponentielle Häufigkeitsverteilung fand Hall (44) nach einer anderen Methode. Er geht nicht von den Trefferkurven aus, sondern von allgemeinen Ansätzen über Treffwahrscheinlichkeit und Überlebenswahrscheinlichkeit. Die hier gewählte Darstellungsart hat den Vorteil, daß man sofort das Verhalten der Dosiseffektkurve ablesen kann, falls die β_n nicht die theoretischen Werte haben.

Damit man eine exakte Exponentialfunktion erhält, müssen Objekte bis zu beliebig hoher Trefferzahl vorhanden sein. Praktisch machen sich jedoch Abweichungen erst bei mehr hohen Dosen bemerkbar, wenn β_1 und $n_{\max}$ nicht zu klein sind. Die Kurve wird dann nach höheren Dosen zu steiler. Bei einem Gemisch nur aus Ein- und Zweitreffern hat man folgende Abweichungen von der Exponentialfunktion:

	$\beta_1 = 0,9$	$\beta_1 = 0,8$	$\beta_1 = 0,7$
$\beta_1 \lambda D = 1$	1 ;	0,6 %	2,4 %
			6,0 %
$= 2$	0,8 %	3,8 %	15,6 %

Bei $\beta_1 \lambda D = 1$ liegt die D_{37} des Exponentialgemisches mit der theoretischen Häufigkeitsverteilung.

Sind nur Eintrefferobjekte und Objekte mit einer Trefferzahl $n > 2$ vorhanden, so findet man schon bei kleinen Dosen starke Abweichungen vom exponentiellen Kurvenverlauf. So erhält man bei einem Gemisch aus Ein- und Dreitrefferobjekten bereits für $B_1 = 0,9$ und $B_1 \lambda_1 D = 1$ eine Abweichung von 7 % von der Exponentialkurve mit derselben Anfangstangente. Bei kleinerem B_1 und größerer Trefferzahl werden die Abweichungen noch größer. Die Kurve wird zunächst flacher und später wieder steiler, wie man durch Differentiation von $\log N/N_0$ sofort feststellen kann.

Sind überhaupt keine Eintrefferobjekte vorhanden, so beginnt die Kurve mit wagrechter Anfangstangente und verläuft bei kleinen Dosen mindestens ebenso flach wie eine Zweitrefferkurve.

Fall 1 b) : Die λ_n seien verschieden.

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß bei einem Gemisch aus Ein- und Mehrtrefferobjekten der Treffbereich in allen Fällen dieselbe Größe hat, unabhängig von der Trefferzahl. Um zu untersuchen, ob sich im allgemeinen Fall ein Exponentialgemisch herstellen läßt, kann man davon ausgehen, daß die Exponentialfunktion in halologarithmischer Darstellung eine Gerade ist, also $d(\ln N/N_0)/dD = \text{const.}$ sein muß. Man findet für das Gemisch:

$$\frac{d(\ln N/N_0)}{dD} = \frac{d(N/N_0)/dD}{N/N_0} = - \frac{\sum_{n=1}^{\infty} B_n \lambda_n \frac{D^{n-1}}{(n-1)!} e^{-\lambda_n D}}{\sum_{n=1}^{\infty} B_n e^{-\lambda_n D} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(\lambda_n D)^k}{k!}} \quad (*)$$

Für $D = 0$ ist:

$$d(\ln N/N_0) / dD = - B_1 \lambda_1$$

Bei einem Exponentialgemisch muß der Differentialquotient denselben Wert für alle beliebigen D annehmen, insbesondere auch für $D \rightarrow \infty$:

Es sei λ_m das kleinste aller λ_n . Dann multipliziert man Zähler und Nenner des Ausdrucks (*) mit $e^{\lambda_m D}$. Es bleibt in jedem Glied, mit Ausnahme des m -ten, eine Exponentialfunktion mit negativem Exponenten stehen, die für $D \rightarrow \infty$ stärker gegen Null geht als jede Potenz von D . Die höchste Potenz von D im m -ten Glied ist D^{m-1} . Man kürzt also noch mit D^{m-1} und läßt dann $D \rightarrow \infty$ gehen. Dabei findet man

$$\frac{d(\ln N/N_0)}{dD} = - \frac{B_m \lambda_m^m / (m-1)!}{B_m \lambda_m^{m-1} / (m-1)!} = - \lambda_m = - B_1 \lambda_1$$

Damit ein Exponentialgemisch entstehen kann, muß also der kleinste vorkommende Treffbereich mit der Größe des Treffbereichs

für den Eintreffer und dem Anteil der Eintrefferobjekte verknüpft sein. Diese Bedingung mag zwar gelegentlich zutreffen, aber es ist nicht anzunehmen, daß sich auch λ_m ändert, wenn $\beta_1 \lambda_1$ geändert wird. Daher wäre auch nicht zu erwarten, daß man unter den verschiedensten Versuchsbedingungen immer eine exponentielle Dosiseffektkurve erhält.

Außerdem handelt es sich dabei nur um eine notwendige Bedingung, aber nicht um eine hinreichende, denn wenn die Ableitung für $D = 0$ und $D \rightarrow \infty$ übereinstimmt, so ist damit noch nicht gesagt, daß das auch für alle übrigen Werte von D der Fall ist. Für die Zwischenwerte erhält man jedoch sehr komplizierte Ausdrücke, die sich nur schlecht behandeln lassen.

Versucht man, ein Exponentialgemisch aus Ein- und n-Trefferobjekten einheitlicher Trefferzahl zusammenzusetzen, so zeigt sich, daß das nicht geht. Es sei

$$N/N_0 = \beta_1 e^{-\lambda_1 D} + \beta_2 e^{-\lambda_2 D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_2 D)^k}{k!} = e^{-\beta_1 \lambda_1 D}$$

$$\lambda_2 = \lambda_m = \beta_1 \lambda_1; \quad \beta_2 = 1 - \beta_1$$

Daraus folgt:

$$\beta_1 e^{-\lambda_1 D} + e^{-\beta_1 \lambda_1 D} \left\{ (1 - \beta_1) \left(\sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_2 D)^k}{k!} \right) - 1 \right\} = 0$$

Diese Gleichung läßt sich nur dann erfüllen, wenn $\beta_1 = 1$.

Macht man eine Reihenentwicklung und ordnet nach Potenzen von D , so erhält man

$$\begin{aligned} N/N_0 &= \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n e^{-\lambda_n D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_n D)^k}{k!} = \\ &= \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n - D \cdot (\beta_1 \lambda_1) + \frac{D^2}{2!} (\beta_1 \lambda_1^2 - \beta_2 \lambda_2^2) - \frac{D^3}{3!} (\beta_1 \lambda_1^3 - 2\beta_2 \lambda_2^3 + \beta_3 \lambda_3^3) + \\ &\quad + \dots + \frac{D^n}{n!} \left\{ \sum_{v=1}^n (-1)^{v-1} \beta_v \lambda_v^n \binom{n-1}{v-1} \right\} + \dots \end{aligned}$$

Damit man eine Exponentialfunktion erhält, müssen, da $\sum \beta_n = 1$, die Klammerausdrücke jeweils den entsprechenden Potenzen von $\beta_1 \lambda_1$ gleich sein, allgemein:

$$\sum_{v=1}^n (-1)^{v-1} \beta_v \lambda_v^n \binom{n-1}{v-1} = \beta_1^n \lambda_1^n$$

$$\text{oder} \quad \beta_n \lambda_n^n = \beta_1^n \lambda_1^n - \sum_{v=1}^{n-1} (-1)^{v-1} \beta_v \lambda_v^n \binom{n-1}{v-1}$$

Daraus berechnet man:

$$\frac{\lambda_2^2}{\lambda_1^2} = \frac{\beta_1}{\beta_2} (1 - \beta_1); \quad \frac{\lambda_3^3}{\lambda_1^3} = \frac{\beta_1}{\beta_3} \left\{ \beta_1^2 - 1 + 2 \sqrt{\frac{\beta_2}{\beta_1} (1 - \beta_1)^3} \right\}; \dots$$

Man sieht also, daß sämtliche λ sehr eng mit den β verknüpft sind. Ändert sich bei geänderten Versuchsbedingungen die Größe

der Trefferbereiche nicht bei allen Objekten um denselben Faktor, so muß sich auch die Häufigkeitsverteilung der Ein- und Mehrtrefferobjekte ändern, damit eine exponentielle Dosiseffektkurve erhalten bleibt; nimmt man an, daß die λ_n alle konstant bleibend, so können sich die β_n nur in sehr spezieller Weise ändern.

Natürlich kann man auch hier einen innerhalb der Meßgenauigkeit exponentiellen Kurvenverlauf erhalten, wenn auch die Bedingungen für die β_n und die λ_n nicht erfüllt sind, vorausgesetzt, daß die Dosis nicht zu groß und β_1 nicht sehr viel kleiner als eins ist.

Fall 2):
$$N/N_0 = \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n \{ 1 - (1 - e^{-\lambda_n D})^n \}$$

a) Sonderfall: alle $\lambda_n = \lambda$.

$$\frac{d \ln(N/N_0)}{dD} = \frac{-\lambda e^{-\lambda D} \sum_{n=1}^{\infty} n \beta_n (1 - e^{-\lambda D})^{n-1}}{\sum_{n=1}^{\infty} \beta_n [1 - (1 - e^{-\lambda D})^n]}$$

D = 0:
$$\frac{d \ln(N/N_0)}{dD} = -\beta_1 \lambda$$

D $\rightarrow \infty$: Kürzen mit $e^{-\lambda D}$:

$$\frac{d \ln(N/N_0)}{dD} = \frac{-\lambda \sum_{n=1}^{\infty} n \beta_n (1 - e^{-\lambda D})^{n-1}}{\beta_n \{ e^{\lambda D} - (1 - e^{-\lambda D})^n \cdot e^{\lambda D} \}}$$

Man berücksichtigt, daß

$$e^{\lambda D} (1 - e^{-\lambda D})^n = e^{\lambda D} (1 - n e^{-\lambda D} + \binom{n}{2} e^{-2\lambda D} - \dots = e^{\lambda D} - n + \binom{n}{2} e^{-\lambda D} - \dots$$

läßt dann $D \rightarrow \infty$ gehen und erhält

$$\frac{d \ln(N/N_0)}{dD} = -\lambda \frac{\sum_{n=1}^{\infty} n \beta_n}{\sum_{n=1}^{\infty} \beta_n \cdot n} = -\lambda$$

Damit der Differentialquotient für $D = 0$ und $D \rightarrow \infty$ der gleiche ist, muß $\beta_1 = 1$ sein; es ist also nicht möglich, ein Exponentialgemisch aus Ein- und Mehrtrefferobjekten herzustellen.

Innerhalb der Meßgenauigkeit exponentiellen Kurvenverlauf erhält man für kleine Dosen und β_1 nahe an eins. Bei einem Gemisch aus Ein- und Zweitrefferoobjekten beträgt die Abweichung von $\exp(-\beta_1 \lambda D)$ für $\lambda D = 1$ und $\beta_1 = 0,8$ bereits 8 %; für $\beta_1 = 0,9$ ist sie 4 %. $\lambda D = 1$ entspricht dabei näherungsweise der experimentell gefundenen D_{37} .

b) Die λ_n seien verschieden.

$$\frac{d \ln(N/N_0)}{dD} = \frac{-\sum_{n=1}^{\infty} n \beta_n \lambda_n e^{-\lambda_n D} (1 - e^{-\lambda_n D})^{n-1}}{\sum_{n=1}^{\infty} \beta_n [1 - (1 - e^{-\lambda_n D})^n]}$$

$$\underline{D = 0:} \quad \frac{d \ln (N/N_0)}{dD} = -\beta_1 \lambda_1$$

$\underline{D \rightarrow \infty:}$ Es sei λ_m das kleinste der λ_n . Kürzen mit $e^{-\lambda_m D}$:

$$\frac{d \ln (N/N_0)}{dD} = - \frac{m\beta_m \lambda_m (1 - e^{-\lambda_m D})^{m-1} + \sum_{n \neq m} n\beta_n \lambda_n e^{-(\lambda_n - \lambda_m)D} \cdot (1 - e^{-\lambda_m D})^{n-1}}{\beta_m (m - (\frac{m}{2})e^{-\lambda_m D} + \dots) + \sum_{n \neq m} \beta_n (n e^{-(\lambda_n - \lambda_m)D} + \dots)}$$

Läßt man nun $D \rightarrow \infty$ gehen, so bleibt

$$\frac{d \ln (N/N_0)}{dD} = -\lambda_m = -\beta_1 \lambda_1$$

Es ist also wieder der kleinste vorkommende Treffbereich mit dem Treffbereich und dem Anteil der Eintrefferobjekte verknüpft.

Aus Ein- und Zweitrefferobjekten läßt sich ein exaktes Exponentialgemisch zusammensetzen, wenn $\beta_1 = \beta_2 = \lambda_2 / \lambda_1 = 0,5$:

$$N/N_0 = 0,5 e^{-\lambda_1 D} + 0,5 (2 e^{-0,5 \lambda_1 D} - e^{-2 \cdot 0,5 \lambda_1 D}) = e^{-0,5 \lambda_1 D}$$

Für alle anderen Werte von β_1 und β_2 erhält man in halblogarithmischer Darstellung gekrümmte Kurven mit einem Wendepunkt, wenn die Bedingung $\lambda_2 = \beta_1 \lambda_1$ erfüllt ist.

Aus Ein- und n -Trefferobjekten ($n > 2$) läßt sich kein exaktes Exponentialgemisch herstellen, da man die Exponenten nicht mehr so wählen kann, daß sich alle e -Funktionen bis auf eine wegheben. Einen näherungsweise exponentiellen Kurvenverlauf über eine Dekade erhält man bei einem Gemisch aus Ein- und Dreitrefferobjekten bis $\beta_1 = 0,5$; bei noch kleinerem β_1 machen sich Abweichungen bemerkbar. Voraussetzung ist dabei aber, daß die Bedingung für die λ erfüllt ist.

$$\underline{\text{Fall 3):}} \quad N/N_0 = \prod_{n=1}^{\infty} \left\{ e^{-\lambda_n D} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_n D)^k}{k!} \right\}$$

$$\ln(N/N_0) = \sum_{n=1}^{\infty} \left\{ -\lambda_n D + \ln \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_n D)^k}{k!} \right\} = -\sum_{n=1}^{\infty} \lambda_n D + \sum_{n=2}^{\infty} \ln \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_n D)^k}{k!}$$

$$\frac{d \ln (N/N_0)}{dD} = - \sum_{n=1}^{\infty} \lambda_n + \sum_{n=2}^{\infty} \frac{\sum_{k=0}^{n-1} \frac{k(\lambda_n D)^{k-1}}{k!} \cdot \lambda_n}{\sum_{k=0}^{n-1} \frac{(\lambda_n D)^k}{k!}}$$

$$\underline{D = 0:} \quad \frac{d \ln (N/N_0)}{dD} = - \sum_{n=1}^{\infty} \lambda_n + \sum_{n=2}^{\infty} \lambda_n = -\lambda_1$$

$$\underline{D \rightarrow \infty:} \quad \frac{d \ln (N/N_0)}{dD} = - \sum_{n=1}^{\infty} \lambda_n = -\lambda_1 - \sum_{n=2}^{\infty} \lambda_n$$

Fall 4:
$$N/N_0 = \prod_{n=1}^{\infty} \{ 1 - (1 - e^{-\lambda_n D})^n \}$$

$$\ln (N/N_0) = -\lambda_1 D + \sum_{n=2}^{\infty} \ln [1 - (1 - e^{-\lambda_n D})^n]$$

$$\begin{aligned} \frac{d \ln (N/N_0)}{dD} &= -\lambda_1 + \sum_{n=2}^{\infty} \frac{-n \lambda_n e^{-\lambda_n D} (1 - e^{-\lambda_n D})^{n-1}}{1 - (1 - e^{-\lambda_n D})^n} \\ &= -\lambda_1 + \sum_{n=2}^{\infty} \frac{-n \lambda_n e^{-\lambda_n D} (1 - e^{-\lambda_n D})^{n-1}}{1 - 1 + n \cdot e^{-\lambda_n D} - \binom{n}{2} e^{-2\lambda_n D} + \dots} \end{aligned}$$

D = 0 :
$$\frac{d \ln (N/N_0)}{dD} = -\lambda_1$$

D → ∞ : Kürzen mit $e^{-\lambda_n D}$:

$$\frac{d \ln (N/N_0)}{dD} = -\lambda_1 - \sum_{n=2}^{\infty} \lambda_n = -\sum_{n=1}^{\infty} \lambda_n$$

In diesen beiden Fällen ist es also überhaupt nicht möglich, ein exaktes Exponentialgemisch aus Ein- und Mehrtrefferobjekten herzustellen. Einen näherungsweise exponentiellen Kurvenverlauf erhält man, wenn $\sum_{n=2}^{\infty} \lambda_n \ll \lambda_1$.

Für nicht zu große Dosen folgt aus der Form der Mennstrefferkurven, daß λ_n um so größer sein darf, je größer n ist, damit die Kurve näherungsweise exponentiell verläuft.

Zusammenfassend kann man sagen, daß man zwar unter gewissen Bedingungen auch bei einem Gemisch aus Ein- und Mehrtrefferobjekten exponentielle Dosiseffektkurven erhalten kann, doch sind diese Bedingungen so speziell, daß sie unter stark wechselnden Versuchsbedingungen, bei denen sich auch die Neigung der Dosis-effektkurve ändert, sicher nicht erhalten bleiben können. Sind die Bedingungen nicht erfüllt, so erhält man nur dann einen näherungsweise exponentiellen Kurvenverlauf, wenn der größte Teil der Bakterien durch einen einzigen Treffer abgetötet wird. Bei einer Population, die nur aus Mehrtrefferobjekten besteht, kann man, wie aus der Arbeit von Dittrich (28) hervorgeht, nur dann einen innerhalb der hier erzielten Meßgenauigkeit exponentiellen Kurvenverlauf erhalten, wenn sich die Treffbereiche der einzelnen Bakterien in ihrer Größe um mehr als eine Zehnerpotenz unterscheiden. Das ist sehr unwahrscheinlich.

Daher kann man schließen, daß es sich bei der "Abtötung" der Bakterien im Wesentlichen um einen Eintreffervorgang handelt. Es gibt somit keine "kleinste biologisch wirksame Dosis", viel-

mehr kann ein Bakterium durch eine einzige Ionisation, die an der richtigen Stelle erzeugt wurde, oder ein einziges, durch die Strahlung erzeugtes Radikal, etc., das an die richtige Stelle diffundiert, seine Koloniebildungsfähigkeit verlieren.

Durch die Versuchsergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein gewisser Prozentsatz von Mehrtrefferobjekten beigemischt ist, der um so kleiner sein muß, je höher die Trefferzahl ist. So wird es verständlich, daß auch in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien exponentielle Dosiseffektkurven gefunden wurden, obwohl hier mit Sicherheit ein gewisser Anteil von Bakterienpaaren, also mindestens Zweitrefferobjekten, vorhanden ist.

Ebenso läßt sich nicht ausschließen, daß innerhalb eines Bakteriums außer dem Eintreffersystem noch andere Systeme vorhanden sind, durch deren Zerstörung der Organismus ebenfalls abgetötet wird, und die mehrere Treffer erfordern. Doch muß die angegebene Bedingung für Treffbereich und Trefferzahl erfüllt sein, nämlich sehr kleiner Treffbereich oder sehr große Trefferzahl. Das Ergebnis erscheint recht vernünftig, da solche Systeme in der Zelle sicher vorhanden sind.

Die Formeln lassen sich noch beliebig komplizieren, wenn man statt der einheitlichen λ_n jeweils eine ganze Verteilungsfunktion für das betreffende λ einführt (Fall 1 und 2), mehrere verschiedene n-Treffersysteme annimmt (Fall 3 und 4) und schließlich noch Fall 1/2 mit Fall 3/4 kombiniert. Doch ergibt sich dabei nichts wesentlich Neues in Bezug auf die Konstruktion von Exponentialgemischen.

Nicht-exponentielle Dosiseffektkurven anderer Autoren.

Die in der Einleitung besprochenen nichtexponentiellen Dosis-effektkurven, welche von anderen Autoren gefunden wurden, lassen sich auf verschiedene Art verstehen. Gekrümmte Kurven wurden hauptsächlich bei E. coli B/r gefunden, weniger bei E. coli B. Das kann auf einen Unterschied in der inneren Struktur dieser beiden Stämme hindeuten. So fand auch Witkin (119) Kurven unterschiedlicher Form bei der UV-Bestrahlung von E. coli B und B/r, allerdings nicht bei Röntgenbestrahlung (Abb. 35).

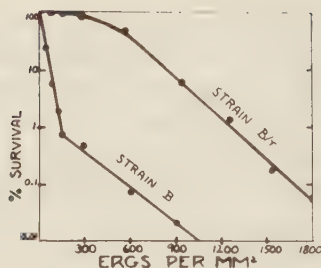


Figure 1

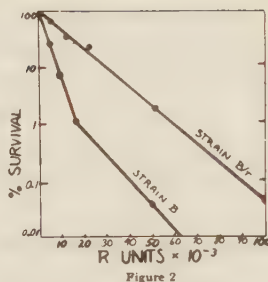


Figure 2

Figure 1. Ultraviolet Survival Curves of Strains B and B/r.

Figure 2. X-Ray Survival Curves of Strains B and B/r.

Abb. 35. Aus: Witkin, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 32 (1946) 59

Lea (78) nimmt an, daß bei sigmoiden Überlebenskurven durch die Bestrahlung im Medium toxische Substanzen entstanden sind; bei kleinen Dosen ist ihre Konzentration zu gering, um Bakterien abzutöten, bei hohen Dosen ist sie groß genug, um eine merkliche Abtötung hervorzurufen, daher wird die Absterbekurve steiler. (Das entspricht im wesentlichen Fall 3/4, wobei die Abtötung durch die toxischen Produkte nach einer Mehrtrefferreaktion erfolgt). Lea, Haines und Coulson (unveröffentlicht, zitiert bei Lea (78)) bestrahlten dieselben Bakterien wie Holweck (56) und Lacassagne (75) mit derselben Wellenlänge und fanden eine exponentielle Kurve; die Überlebensrate war bei gegebener Dosis größer als bei Holweck und Lacassagne, besonders bei großen Dosen.

Nun ist E. coli B/r resistenter, benötigt zur Abtötung auf eine bestimmte Überlebensrate also größere Dosen als E. coli B. Daher können sich beim Stamm B/r auch toxische Bestrahlungsprodukte im Medium stärker auswirken als bei Stamm B. Bei E. coli B wurde in der vorliegenden Arbeit nur eine ganz geringe Andeutung eines Einflusses solcher toxischer Substanzen im Medium gefunden (Abb. 36). Die Bakterien wurden teils längere Zeit nach der Bestrahlung unverdünnt stehen gelassen, teils sofort nach der Bestrahlung um einen Faktor 11^2 verdünnt. Der Unterschied der beiden Dosis-effekt-kurven ist nur gering. Eine Verdünnung um einen Faktor 11^4 lieferte dasselbe Ergebnis.

Es ist auch zu berücksichtigen, daß selbst bei einem Eintreffervorgang eine Art von Erholung auftreten kann, falls es

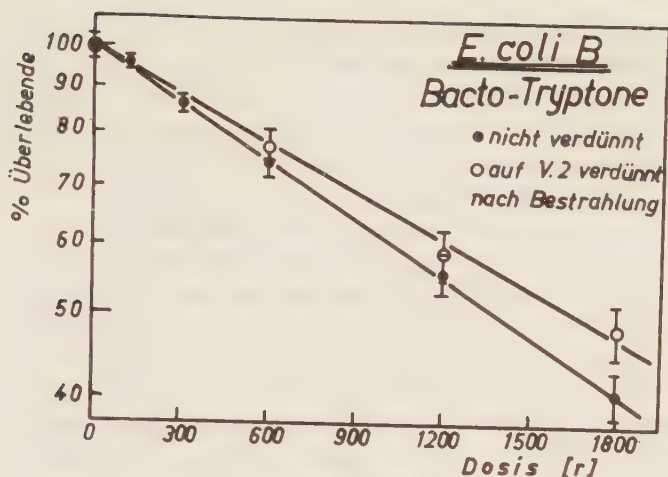


Abb. 36.

nämlich möglich ist, durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen das durch die Strahlenwirkung veränderte, wichtige Molekül wieder in den ursprünglichen Zustand zurückzubringen oder auch neu zu synthetisieren, bevor es im Verlauf der Stoffwechselvorgänge benötigt wird. Sind mehrere wichtige Moleküle vorhanden, wobei die Veränderung eines einzigen zur Inaktivierung des Organismus führt (unterteilter Treffbereich), so werden bei höheren Dosen mehrere Unterbereiche getroffen, es ist aber unwahrscheinlich, daß auch alle gleicherweise wiederhergestellt werden. Daher ist in diesem Fall eine Dosiseffektkurve zu erwarten, die in ihrem Verlauf einer Mehrtrefferkurve ähnelt.

Weiterhin fällt bei einem Vergleich der verschiedenen Arbeiten auf, daß immer die Koloniebildung auf der Oberfläche von Nähragar untersucht wurde, wenn bei *E. coli* Mehrtrefferkurven gefunden wurden. Wenn die Koloniebildung im Innern von Nähragar untersucht wurde, wie es auch in dieser Arbeit geschah, waren es praktisch immer exponentielle Kurven. Das könnte darauf hindeuten, daß für die Koloniebildungsfähigkeit unter völlig aeroben Bedingungen ein Mehrtreffersystem mit verantwortlich ist, während das im Innern von Agar nicht der Fall ist, wo der Sauerstoff nur langsam an die Bakterien herandiffundieren kann. Es könnte aber auch einfach durch die Versuchstechnik bedingt

sein. Bei Oberflächenkolonien hat man eine größere Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Koloniezahl. Damit die Kolonien nicht zusammenwachsen, dürfen höchstens 100 - 200 Kolonien/Platte vorhanden sein, oder man muß die noch kleinen Kolonien nach wenigen Stunden Inkubationszeit auszählen. Im ersten Fall hat man einen großen statistischen Fehler, im zweiten besteht die Gefahr, daß bestrahlte, aber vermehrungsfähige Bakterien etwas länger brauchen, bis sie zu sichtbaren Kolonien herangewachsen sind, und daher nicht mitgezählt werden. Aus diesem Grunde wurden auch in der vorliegenden Arbeit keine Oberflächenkulturen untersucht.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse läßt sich die Annahme von Houtermans (61), die Dosiseffekturven seien im Wesentlichen durch die "biologische Variabilität" der Organismen und nicht durch ein Treffergeschehen bestimmt, keinesfalls halten, wie man an einem konkreten Beispiel, etwa Abb. 14, sofort zeigen kann. Unter der Annahme, daß jedes Bakterium dann abgetötet wird, wenn es eine bestimmte, seiner individuellen Empfindlichkeit entsprechende Dosis erhalten hat, würden also 5 % der gesamten Population eine Dosis zwischen 0 und 60 r benötigen, 5,5 % eine Dosis zwischen 60 und 120 r, usw. Schließlich wäre ein Rest von 25 % so "resistent", daß er erst durch eine Dosis über 2400 r abgetötet würde. Nimmt man noch Abb. 25 hinzu, die in etwa vergleichbar ist, so zeigt sich, daß sogar 0,7 % eine Dosis über 10500 r benötigen (in Abb. 25 hätte man bei 2400 r etwa 32 % Überlebende). Die Bakterien müßten sich also in ihrer "Empfindlichkeit" um einen Faktor > 175 unterscheiden, wenn man die Dosiseffekturven durch "biologische Variabilität" erklären wollte. Für einen derart großen Empfindlichkeitsunterschied ist kein vernünftiger Grund zu sehen, weder im Größenunterschied noch im Unterschied der inneren Struktur von Bakterien ein und derselben Kultur. Dabei ist die Differenz $N(0) - N(60 \text{ r})$ signifikant mit einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,02$. Falls diese Sicherung der Differenz nicht ausreichend erscheint, kann man auch von $N(0) - N(120 \text{ r})$ ausgehen. Diese Differenz ist signifikant mit einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,001$, also praktisch beliebig gut gesichert. Der Unterschied der "Empfindlichkeit" verringert sich in diesem Fall um einen Faktor 2, bleibt aber

immer noch mehr als groß genug. Es ist zu beachten, daß in Abb. 14 b der doppelte statistische Fehler des Mittelwerts eingetragen ist.

Da nicht anzunehmen ist, daß bei E. coli HIG die Strahlentötung im Wesentlichen durch die "biologische Variabilität" bedingt ist, während das bei E. coli B unmöglich der Fall sein kann, so sind die Ergebnisse von Houtermans, soweit sie überhaupt reell sind, als Mehrtreffer oder Gemische aus Ein- und Mehrtreffervorgängen zu deuten.

Aus der Angabe von Houtermans, daß im Mittel 2 - 3 Kolonien pro Gesichtsfeld vorhanden waren, folgt bei einem Nulleffekt von 0,05 %, bei dem die stärksten Abweichungen vom exponentiellen Kurvenverlauf gefunden wurden, daß auf 700 - 1000 Gesichtsfelder erst ein inaktiviertes Bakterium kam. Selbst bei einer Inaktivierungsrate von 5 % kommt nur ein inaktiviertes Bakterium auf 7 - 10 Gesichtsfelder. Die Erfahrung lehrt, daß bei einer derart geringen Dichte die Zahl der gefundenen Inaktivierten mehr von der Sorgfalt abhängt, mit der man die Fläche absucht, als von ihrer tatsächlich vorhandenen Anzahl. Über diese Sorgfalt, etwa charakterisiert durch die Zeit, die zum Absuchen einer bestimmten Anzahl Gesichtsfelder verwendet wurde, ist in der Arbeit nichts gesagt. Man könnte den Kurvenverlauf ganz zwanglos dadurch erklären, daß erst oberhalb einer gewissen Häufigkeit der Inaktivierten ihre wahre Anzahl festgestellt wurde, während sie unterhalb dieser Grenze systematisch zu klein bestimmt wurde. Bei den "alten" Kulturen war der Nulleffekt höher, die Zahl der Inaktivierten daher von vornherein größer und somit genauer zu bestimmen, entsprechend wurden exponentielle Dosiseffektkurven gefunden.

Weiterhin ist die bei Inaktiviertenprozentsätzen unter 5 % verwendete Methode, daß "die Gesamtzahl der Kolonien durch Ermittlung der mittleren Dichte pro Gesichtsfeld und Umrechnung auf die Gesamtfläche abgeschätzt" wurde, nicht ganz überzeugend, da nicht angegeben ist, aus wieviel Gesichtsfeldern der Mittelwert gebildet ist, wie groß seine Streuung war, nach welchen Gesichtspunkten die Felder ausgewählt waren, und nicht einmal der Begriff "Gesamtfläche" näher definiert wird. Denn wenn man einen Tropfen Bakteriensuspension auf ein Agarplättchen bringt, so sind ja die Bakterien nicht bis zum Rande des Plättchens gleichmäßig verteilt; außerhalb des Tropfens sind überhaupt

keine, während sie am Rande des Tropfens meist merklich dichter liegen als im Inneren, wie bei Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit regelmäßig beobachtet wurde. Wenn aber an gewissen Stellen des Plättchens die Bakterien dichter liegen, so können dort die Kolonien die einzelnen inaktivierten Bakterien überwuchern, so daß deren Zahl bei kleinen Inaktivierungsraten ebenfalls systematisch zu gering bestimmt wird.

Auch ist nur die untere Grenze für die Koloniegröße angegeben, nämlich 100 Bakterien/Kolonie, nicht aber die mittlere Größe der Kolonien, welche man benötigt, um abschätzen zu können, welcher Prozentsatz der Fläche von den Kolonien überdeckt war. Um denselben Prozentsatz würde sich auch die Zahl der feststellbaren Inaktivierten vermindern. Der Prozentsatz ist naturgemäß um so höher, je größer die Koloniezahl, also je kleiner die Inaktivierungsrate ist, wenn auf jedes Plättchen etwa dieselbe Gesamtbakterienzahl aufgebracht wurde. Beim Fehlen aller dieser Angaben über Faktoren, welche die Dosiseffektkurven bei kleinen Dosen abflachen können, kann man die Arbeit von Houtermanns keinesfalls als Beweis gegen die Treffertheorie ansehen.

Wenn bei Bakterien in einem bestimmten Wachstumsstadium Dosis-effektkurven mit flachem Anfang gefunden wurden, z.B. die von *E. coli* B/r in der lag-Phase (Stapleton (105-107)), während in anderen Wachstumsstadien derselben Organismen exponentielle Kurven auftraten, so kann der Grund dafür auch sein, daß die in den Zellen vorhandene strahlenempfindliche Substanz sich vervielfacht und getrennt hat, bevor die eigentliche Zellteilung eintritt. So gibt auch Stapleton an, daß die Zahl der färbbaren "Kernkörperchen" und die Trefferzahl bei den Zellen der lag-Phase etwa übereinstimmten. Den Anteil der Mehrtrefferobjekte in der Population erhält man aus dem Verhältnis: Länge des Zeitintervalls zwischen Teilung der strahlenempfindlichen Substanz und Zellteilung zur Länge des gesamten Teilungszyklus. Dieses Verhältnis kann bei verschiedenen Bakterienstämmen und Versuchsbedingungen verschieden groß sein; bei *E. coli* B und den hier gewählten Versuchsbedingungen ist es offenbar recht klein, da keinerlei Abweichungen vom exponentiellen Kurvenverlauf gefunden wurden, d.h. die Teilung der strahlenempfindlichen Substanz findet erst kurz vor der Zellteilung statt. Bei Vorversuchen

wurden im Phasenkontrastmikroskop gelegentlich auch Kernkörperchen beobachtet, meistens eines, fast nie mehr als zwei, und wenn zwei vorhanden waren, so bildete sich auch meistens bald eine Wand zwischen den Zellhälften aus.

Die Kurven von Hollaender et al. (54) lassen sich formal als Ein- und Mehrtreffermischkurven verstehen. Eine genaue Analyse ist nicht möglich, da zu wenig Meßpunkte, besonders am Kurvenanfang, vorliegen. (Ganz entsprechendes gilt auch für die übrigen Arbeiten, bei denen gekrümmte Dosiseffektkurven gefunden wurden). Hollaender et al. selbst sprechen nur allgemein von "Schutzsystemen" und "verschiedenen Wirkungsmechanismen", äußern sich aber nicht näher darüber, wie man sich diese Mechanismen vorzustellen hat. Eine ganz vernünftige Deutung findet man folgendermaßen:

Unter Versuchsbedingungen, bei denen eine Eintrefferkurve vorliegt, sei $N/N_0 = e^{-\lambda D}$. Bei konstanten Bestrahlungsbedingungen sei λ kurz als "Trefferbereich" bezeichnet. Nach geänderten Kulturbedingungen sei ein Unterbereich λ_1 , n Unterbereiche λ_n , m Unterbereiche λ_m , usw., vorhanden. Zur Abtötung des Organismus soll λ_1 einmal, oder die n Bereiche λ_n je einmal, etc., getroffen werden (Fall 4). Dann gilt für Mischkurve und Eintrefferkurve bei einer bestimmten Dosis D :

$$\frac{N_M}{N_E} = \frac{e^{-\lambda_1 D} (n e^{-\lambda_n D} - (\frac{n}{2}) e^{-2\lambda_n D} + \dots) (m e^{-\lambda_m D} - (\frac{m}{2}) e^{-2\lambda_m D} + \dots) \dots}{e^{-\lambda D}}$$

Für $D \rightarrow \infty$ ist

$$\frac{N_M}{N_E} = \frac{e^{-\lambda_1 D} \cdot n e^{-\lambda_n D} \cdot m e^{-\lambda_m D} \dots}{e^{-\lambda D}} = \left\{ \begin{matrix} 0 \\ n \cdot m \dots \end{matrix} \right\} \text{ wenn } \lambda_1 + \lambda_n + \lambda_m + \dots > \lambda$$

Da die Kurven von Hollaender et al. bei hohen Dosen parallel verlaufen, folgt daraus: Von dem ursprünglichen Trefferbereich λ hat sich bei geänderten Kulturbedingungen ein Unterbereich λ_n ver-n-facht, ein Bereich λ_m ver-m-facht usw., während der Rest λ_1 einfach geblieben ist.

Nach dem weiter oben Gesagten ist es übrigens nicht notwendig, daß tatsächlich n Trefferbereiche λ_n usw. vorhanden sind, sondern es genügt auch, daß durch die geänderten Versuchsbedingungen eine entsprechende Zahl von Unterbereichen reaktivierbar geworden ist.

Es ist zu berücksichtigen, daß es sich hier nur um eine von mehreren Deutungsmöglichkeiten handelt, da sich Mehrtrefferkurven verschiedener Art sehr ähnlich sehen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Frage nicht näher untersucht werden, da weder bei anaerober Kultur noch bei Glucosezusatz zum Nährmedium irgendwelche gekrümmten Dosiseffekturven gefunden wurden. Nach einer neuen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Hollaender (Adler und Engel (1)) ist es für das Auftreten der gekrümmten Dosiseffekturven wesentlich, daß bei der Kultur der Bakterien vor der Bestrahlung gleichzeitig Glucose und ganz bestimmte Aminosäuren angeboten werden. Dies dürfte der Grund für das unterschiedliche Verhalten der Bakterien bei Hollaender et al. (54) und hier sein. Hier wurden nur einmal bei einem Vorversuch von Pauly (unveröffentlicht) E. coli bestrahlt, die in Bacto-Tryptone + 2 % Glucose gewachsen waren; die gefundene Dosis-effektkurve war innerhalb der Meßgenauigkeit ebenfalls exponentiell und das Medium wurde dann, da es keine neuartigen Ergebnisse lieferte, nicht mehr weiter benutzt. Es ist vielleicht möglich, daß die betreffenden Aminosäuren in Bacto-Tryptone nicht oder in zu geringer Menge vorhanden sind.

Man kann sich im Rahmen der oben entwickelten Anschauungen vorstellen, daß sich bei gleichzeitigem Angebot von Glucose und Aminosäuren Vorratsstoffe in der Zelle bilden können, die zu einer Vervielfachung einzelner Untertreffbereiche führen; dies müßte durch eine Analyse des Zellinhalts festzustellen sein. Die Autoren selbst sprechen nur ganz allgemein von der Synthese eines Schutz- oder Erholungssystems unter diesen Bedingungen.

Die Änderung der Kurven bei Bestrahlung unter aeroben oder anaeroben Bedingungen läßt sich am einfachsten als Änderung der "wirksamen Dosis" verstehen, da Hollaender et al. (54) angeben, daß das Verhältnis der Empfindlichkeit bei aerober und anaerober Bestrahlung praktisch unabhängig von der Vorbehandlung der Bakterien war. Über diese Frage wird im folgenden Teil der Diskussion noch gesprochen.

2) Abhängigkeit der D_{37} vom Kulturalter.

Um die Abhängigkeit der D_{37} vom Kulturalter zu verstehen, wird man versuchen, sie in Zusammenhang zu bringen mit Veränderungen in den Zellen oder deren Umgebung während des Wachstumszyklus.

Bei den aerob in C-Medium gewachsenen Bakterien steigt die D_{37} monoton mit zunehmendem Kulturalter an, außerdem findet man ein sehr plötzliches Absinken der D_{37} beim Einbringen der Zellen in frisches Medium. Man könnte daher vielleicht den Einwand erheben, der Einfluß des Kulturalters sei in Wirklichkeit nur ein Sauerstoffeffekt; die Bakterien vermehren sich um drei Zehnerpotenzen, verbrauchen also mehr Sauerstoff, so daß auch trotz ständiger Zufuhr weniger in der Lösung verbleibt, daher erscheinen die Bakterien resistenter.

Wäre das richtig, so müßten aber die Kurven einen anderen Verlauf zeigen, denn sowie der Nährstoff aufgebraucht ist, geht die Atmung der Bakterien zurück, es bleibt nur eine ganz geringe endogene Atmung übrig. Da weniger Sauerstoff verbraucht, aber gleich viel nachgeliefert wird, müßte seine Konzentration wieder steigen, die Bakterien empfindlicher werden und somit die D_{37} im Laufe der stationären Phase wieder absinken. Außerdem dürfte sich die D_{37} bei den "stark aerob" bestrahlten Bakterien nicht ändern, denn bei 0°C ist der Stoffwechsel praktisch völlig eingestellt, es wird also auch kein Sauerstoff verbraucht.

Aus den Angaben von Paine und Clark (87) über die endogene Atmung von *E. coli* folgt, daß $5 \cdot 10^9$ Zellen - das ist die hier gefundene maximale Zahl von Bakterien/ml - bei 37°C etwa $20 \text{ mm}^3 \text{ O}_2/\text{Std.}$ verbrauchen, wobei der Sauerstoffverbrauch im Laufe der Zeit noch etwas abnimmt. Andererseits lösen sich in 1 cm^3 Wasser von 37°C etwa 5 mm^3 Sauerstoff, bei normalem Atmosphärendruck. Da die Bakterien bei 37°C dauernd belüftet und nach der Entnahme sofort in ein Wasserbad von 0°C gebracht wurden, wo sie sich sehr schnell abkühlen, so enthielt die Suspension mit Zellen der stationären Phase also höchstens einige % weniger Sauerstoff gelöst als eine Suspension mit Zellen der früheren Wachstumsphasen. Dieser geringe Unterschied kann aber den großen Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit nicht erklären.

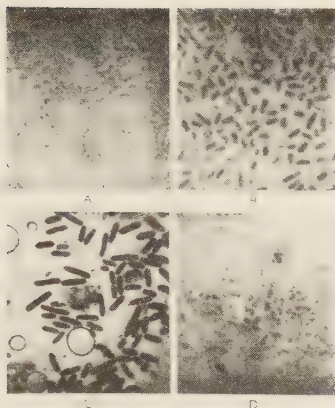
Ebenso kann ein "Sauerstoffeffekt" nicht erklären, wieso die D_{37} noch weiter ansteigt, nachdem die stationäre Phase schon erreicht ist, weder die Zellzahl noch die Zellmasse sich weiter vermehrt und die Atmung sogar absinkt.

Wegen dieses Anstiegs der D_{37} nach dem Erreichen der stationären Phase kommt auch der "Konzentrationseffekt", den Biagini (10) annimmt, nicht für eine Erklärung in Frage, ganz abgesehen davon, daß wegen der viel zu geringen Reichweite der Radikale (Hutchinson (64): ca. 30 Å bis einige 100 Å) ein solcher Konzentrationseffekt überhaupt sehr unwahrscheinlich ist. Zwar gilt diese Reichweite nur für das Innere der Zellen und nicht für das Außenmedium, doch ist bereits die Zellwand der Bakterien zu dick, als daß ein von außen kommendes Radikal hindurchdringen und etwa an das genetische Material gelangen könnte.

Man wird sich also überlegen, ob in den Zellen selbst Veränderungen vor sich gehen, die für die Änderung der Strahlenempfindlichkeit bei verschiedenem Kulturalter verantwortlich gemacht werden können. In der Tat ist es bekannt, daß Zellen verschiedener Wachstumsstadien eine recht unterschiedliche Zusammensetzung haben. So zeigte Caspersson (18) durch Messung der charakteristischen UV-Absorption bei 2600 Å, daß in ruhenden Bakterien der Nukleinsäuregehalt sehr gering ist; bringt man die Zellen in frisches Nährmedium, so steigt er an, erreicht in der exponentiellen Wachstumsphase ein Maximum, sinkt mit beginnender stationärer Phase wieder ab und erreicht schließlich den ursprünglichen niedrigen Wert. (Abb. 37). Man sieht jedoch sofort, daß der Nukleinsäuregehalt weder parallel noch antiparallel mit der D_{37} in verschiedenen Kulturaltern verläuft.

Nun spielt von den beiden Nukleinsäurearten, DNS und RNS, die mit Hilfe der UV-Absorption gemeinsam gemessen werden, besonders die DNS, also der genetische Apparat der Zelle, bei der Strahlenschädigung eine wichtige Rolle; Lea (78) deutet sogar jede Strahlentötung von Mikroorganismen als Letalmutation.

Doch kann man auch aus den Untersuchungen von Morse und Carter (85), welche frühere Ergebnisse von Malmgren und Heden (83) bestätigten und erweiterten, kaum den Schluß ziehen, daß die Änderung der D_{37} von einer Änderung des DNS-Gehalts herührt. Diese Autoren untersuchten den DNS- und RNS-Gehalt von



Photomicrographs of living bacteria taken under identical photographic conditions at different stages of growth. A. Before the transfer from old medium to new. B. Beginning of lag phase. C. Period of most rapid growth. D. End of growth.

aus : T. Caspersson,
Cell Growth and Cell
Function

Abb. 83, Seite 159

Abb. 37.

E. coli B und *c/r* in den frühen Wachstumsphasen und fanden, daß sofort nach dem Einbringen in frisches Medium die DNS-Menge pro Zelle nur allmählich ansteigt, am Ende der lag-Phase ein Maximum erreicht und dann wieder absinkt, wobei der Maximalwert etwa doppelt so groß war wie der Ausgangswert. Damit läßt sich aber nicht das plötzliche Absinken der D_{37} beim Einbringen in neues Medium erklären; auch wurde am Ende der lag-Phase keine auffallende Besonderheit der D_{37} bemerkt.

Man könnte sich höchstens vorstellen, daß die Bakterien beim Einimpfen in neues Medium sich sehr rasch durch Wasseraufnahme vergrößern, wobei die indirekte Strahlenwirkung innerhalb der Zelle vergrößert werden könnte dadurch, daß nun durch das größere Volumen eine größere Zahl von Radikalen oder anderen Bestrahlungsprodukten zur Verfügung stehen, und daß sich die Änderung des DNS- und des Wassergehalts im Laufe der Kultur gerade so auskompensieren, daß dabei der gefundene Verlauf der D_{37} herauskäme.

Doch zeigten mikroskopische Beobachtungen, daß die Volumenvergrößerung nach dem Einimpfen nicht schlagartig vor sich geht, sondern die Zellen schon bei 37° C ihre Größe erst in 10 - 20 Minuten verdoppeln, während sie bei 0° C ihr Volumen stundenlang überhaupt nicht ändern. Außerdem ist gerade bei den in C-Medium gewachsenen Bakterien der Größenunterschied zwischen den Zellen verschiedenen Kulturalters nicht mehr ausgeprägt.

Eine andere Eigenschaft der Bakterien, welche sich mit zunehmendem Kulturalter ändert, ist ihre Reduktionsfähigkeit gegenüber den verschiedensten Substanzen, und man kann auch versuchen, diese in Zusammenhang mit ihrer Strahlenempfindlichkeit zu bringen.

Die Wirkung ionisierender Strahlen wird durch die Anwesenheit von Sauerstoff stark erhöht. Gray (37, 38) erklärt das dadurch, daß bei der Aufspaltung eines Wassermoleküls durch ionisierende Strahlen in Abwesenheit von Sauerstoff ein H- und ein OH-Radikal entsteht, also ein reduzierendes und ein oxydierendes Äquivalent; in Anwesenheit von Sauerstoff soll sich das H-Radikal mit einem Molekül O_2 verbinden und ein HO_2 - Radikal bilden, das drei oxydierende Äquivalente darstellt. Howard-Flanders und Alper (62) bestreiten die Richtigkeit dieser Anschauung und schlagen statt dessen vor, anzunehmen, daß durch die Ionisation ein lebenswichtiges Trefferbereichs-Molekül in einen sehr reaktionsfähigen Zustand gerät, aus dem es aber in Abwesenheit von Sauerstoff wieder in den Normalzustand zurückgelangen kann. Wenn es jedoch, in Anwesenheit von Sauerstoff, mit einem O_2 -Molekül reagiert, so soll es irreversibel verändert werden, was dann zu einer Schädigung der Zelle führt.

In beiden Fällen wäre aber die Strahlenwirkung, mindestens zum größten Teil, eine Oxydation, und man würde annehmen, daß die Zelle einen Strahlenschaden um so leichter wieder rückgängig machen könnte, je größer ihr Reduktionsvermögen ist. Kopper (72, 73) untersuchte jedoch die Fähigkeit von E. coli, Methyleneblau, Nitrat und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu reduzieren, in Abhängigkeit von ihrem Kulturalter und stellte fest, daß das Reduktionsvermögen der Bakterien mit steigendem Kulturalter abnahm. Mit steigendem Kulturalter steigt aber bei den aerob in C-Medium gewachsenen Bakterien die D_{37} an, d.h. die Strahlenempfindlichkeit der Bakterien sinkt, parallel mit dem Reduktionsvermögen, also gerade umgekehrt, wie man eigentlich erwarten würde.

Daraus ist zu schließen, daß die Systeme, welche für das Reduktionsvermögen der Zelle verantwortlich sind, nicht in der Lage sind, eine durch ionisierende Strahlung in der Zelle verursachte Oxydation wieder rückgängig zu machen. Andererseits bestehen Anzeichen dafür, daß bei den in Nutrient Broth und in

sacto-Tryptone gewachsenen Bakterien die D_{37} bei hohem Kulturalter wieder animmt, die Strahlenempfindlichkeit also in diesem Fall antiparallel zum Reduktionsvermögen der Zellen verläuft. Man kann daher vermuten, daß das Reduktionsvermögen der Zellen nichts mit ihrer Strahlenempfindlichkeit zu tun hat. Dafür spricht auch das Ergebnis des Versuchs, bei dem aerob und streng anaerob gezüchtete Zellen bestrahlt wurden und genau die gleiche Strahlenempfindlichkeit zeigten (Abb. 17).

Greve (40,41) beobachtete, daß die Strahlenempfindlichkeit von Hefe vom Glucosegehalt des Mediums abhing, und stellte fest, daß die Ursache dafür der verschiedene osmotische Druck des Mediums war. Das würde zwar die sehr schnelle Änderung der Strahlenempfindlichkeit beim Einimpfen in neues Medium verständlich machen. Doch sieht man, daß auch diese Erklärungsmöglichkeit nicht in Frage kommt, wenn man die verwendeten Glucosekonzentrationen berücksichtigt: Greve benutzte sehr hohe Konzentrationen, bis zu 14 %, und fand schon bei 4 % Glucose praktisch dieselben Ergebnisse wie in Medium ganz ohne Glucose. In der vorliegenden Arbeit war der Glucosezusatz jedoch nur 0,4 %.

Nach Wels (117) ist die Strahlenempfindlichkeit einer Zelle abhängig vom Wassergehalt ihres Protoplasmas. Er stützt sich dabei auf Arbeiten von Erdmann (31,32). Dieser fand, daß die Strahlenempfindlichkeit von Hefezellen um 10 - 30 % sank, wenn ihnen künstlich Wasser entzogen wurde, so daß das Zellvolumen um 15 - 20 % anahm. An gealterten Zellen stellt er fest, daß diese ihr Wasser schneller an ein hypertonisches Außenmedium abgaben als junge. Andererseits war die Strahlenempfindlichkeit, gemessen an der Hemmung der Teilungsfähigkeit, bei 4 Std. alter Hefe fast dreimal so groß wie bei 11 Tage alter. Dabei wurde die Hefe nach beendeter Gärung dem Bier entnommen und unter Leitungswasser auf Eis gehalten.

Die Strahlenempfindlichkeit der Hefe wurde also, ebenso wie die von E. coli, mit wachsendem Alter der Zellen geringer. Doch kann die Annahme, daß diese Änderung durch einen geänderten Wassergehalt des Protoplasmas bedingt ist, höchstens für die Zellen der stationären Phase gelten, wobei ja bei E. coli die D_{37} im Laufe der Zeit zunächst noch etwas ansteigt. Sie erklärt

auf keinen Fall das Ansteigen der D_{37} schon in der exponentiellen Wachstumsphase, während der die Zellen ja voll teilungsfähig sind und keinerlei Alterungserscheinungen zeigen.

Auch das plötzliche Absinken der D_{37} beim Einbringen in neues Medium läßt sich auf diese Weise nur schwer verstehen; man müßte schon annehmen, daß die Zellen bereits innerhalb von 1 - 2 Minuten die ganze Konstitution ihres Protoplasmas von minimaler auf maximale Wasserbindungsfähigkeit umgestellt hätten. Gegen eine solche Umstellung spricht aber, daß dazu Stoffwechseltvorgänge notwendig wären, und daß ein Absinken der D_{37} auch gefunden wurde, wenn die Bakterien in neues C-Medium ohne Glucose eingebracht wurden, in dem mangels einer Energiequelle solche Stoffwechseltvorgänge nicht möglich sind. Sowohl die Bakterienzahl als auch die D_{37} blieb in diesem Medium konstant; das zeigt, daß keine Nährstoffreste in das Medium verschleppt wurden, und daß die D_{37} auch nicht durch ein weiteres "Altern" der Zellen beeinflusst wurde. In Medium mit Glucose, in das Zellen aus derselben Kultur übertragen wurden, stieg dagegen die D_{37} wieder an, nachdem sie beim Einimpfen auf nahezu denselben Wert abgesunken war wie in C-Medium ohne Glucose.

Wegen dieses Verhaltens scheint es überhaupt wahrscheinlicher zu sein, daß die Änderung der Strahlenempfindlichkeit weniger durch eine Änderung des eigentlichen Zellstoffwechsels bedingt ist, sondern eher durch Änderungen des umgebenden Mediums und eine dadurch bedingte Änderung der Reaktionslage der Zelle bzw. der "wirksamen Dosis".

Zunächst ist an eine Änderung des pH-Wertes im Laufe der Kultur zu denken. Bei den anaerob in C-Medium gewachsenen Bakterien sinkt der pH-Wert ziemlich stark ab; von pH 6,8 beim Einimpfen auf pH 5,3 nach 18 Stunden, bei längerem Stehen sogar auf ungefähr pH 4. Es fiel auch gelegentlich auf, daß längere Zeit in dem sauren Medium gestandene Bakterien eine besonders hohe D_{37} zeigten.

Diese starken Änderungen des pH-Wertes wurden jedoch nur bei den anaerob in C-Medium gewachsenen Bakterien gefunden. Auch bei den aerob in C-Medium gewachsenen Bakterien sank der pH-Wert im Laufe der Kultur etwas ab, jedoch längst nicht so stark wie bei den anaerob gewachsenen, nämlich von pH 6,8 auf pH 6,5 nach 24 Stunden.

Es wäre zwar denkbar, daß der Einfluß des pH-Werts auf die Strahlenempfindlichkeit von den Kulturbedingungen abhängt und bei den aerob gewachsenen viel stärker ist als bei den anaerob gewachsenen. (Es konnte nicht untersucht werden, ob der pH-Wert bei den aerob gewachsenen Bakterien wirklich parallel mit ihrer Strahlenempfindlichkeit ging, da er nur mit Indikatorpapier bestimmt werden konnte, was bei den gefundenen recht geringen Unterschieden zu ungenau ist). Doch ist es schwierig, sich einen Mechanismus vorzustellen, durch den so kleine Unterschiede im pH-Wert so ausgeprägte Änderungen der Strahlenempfindlichkeit hervorrufen könnten. Außerdem ist das Ansteigen der D_{37} schon während der frühen exponentiellen Wachstumsphase dadurch nicht recht verständlich, denn in diesem Stadium ändert sich wegen der Pufferwirkung des Mediums der pH-Wert praktisch überhaupt nicht.

An *E. coli* B/r untersuchte Sargent (103) den Einfluß des pH-Werts während des Wachstums und der Bestrahlung auf die Strahlenempfindlichkeit. Die Bakterien wurden in Difco Nutrient Broth mit 0,3 % Glucosezusatz bei pH 5, 7, und 8,5 gezüchtet. Bei pH 5 gewachsene Bakterien zeigten eine etwas gekrümmte Dosiseffektkurve und brauchten zum Erreichen der gleichen Inaktivierung eine um einen Faktor 1,5 bis 2 größere Dosis als die bei pH 7 gewachsenen. Außerdem war die Strahlenempfindlichkeit nur abhängig von dem pH-Wert des Mediums, in dem die Bakterien gewachsen waren, aber praktisch nicht vom pH-Wert während der Bestrahlung. Das spricht eigentlich dagegen, daß das hier beobachtete rasche Absinken der D_{37} beim Einimpfen durch die Änderung des pH-Wertes bedingt ist. Allerdings handelt es sich bei Sargent um einen anderen Bakterienstamm und andere Kulturbedingungen.

Sargent zitiert auch eine Reihe von Arbeiten, die sich mit dem Einfluß des pH-Werts auf die Strahlenempfindlichkeit verschiedener Objekte befassen. Daraus geht hervor, daß dieser Einfluß eigentlich noch reichlich ungeklärt ist; in den meisten Fällen ließen sich die gefundenen Effekte auch auf andere Weise interpretieren, oder die Ergebnisse verschiedener Autoren waren widersprüchlich.

Es bleibt noch die Möglichkeit zu besprechen, daß die Bakterien bei ihrem Wachstum in ihrem Innern Strahlenschutzsubstanzen synthetisieren, die z. T. in das Medium diffundieren können. Diese Annahme verträgt sich am besten mit den gefundenen Ergebnissen. Das synthetische C-Medium enthält außer Glucose keine organischen Stoffe; beim Einbringen der Bakterien werden daher diese Schutzstoffe zu einem verhältnismäßig großen Teil aus den Zellen herausdiffundieren. Für einen reinen Diffusionsvorgang stand ja genügend Zeit zur Verfügung, denn dieser wird durch die Abkühlung der Suspension auf 0° C nur wenig beeinflusst. Mit zunehmendem Kulturalter stieg dann die Konzentration der Schutzstoffe und damit die D_{37} wieder an. Nach dem Erreichen der stationären Phase, wenn die Zellen ihren Stoffwechsel nahezu eingestellt haben, kann dann noch der eine oder andere der weiter oben erwähnten Faktoren, die für sich allein den Verlauf der D_{37} nicht erklären konnten, mitgewirkt haben, die D_{37} noch weiter zu erhöhen.

Wenn die Bakterien nur einmal gewaschen werden, aber ihre Zahl pro cm^3 konstant gehalten wird, so ist kein so großer Einfluß auf die D_{37} zu erwarten wie beim Einimpfen in C-Medium, wobei ihre Konzentration um einen Faktor 100 vermindert wurde, da sich zwischen Zelle und Medium ein Gleichgewicht einstellen wird. In der Tat wurde zwischen gewaschenen und nicht gewaschenen Bakterien kein auffallender Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit gefunden.

Das Ergebnis bei den Bakterien, die in C-Medium ohne Glucose gebracht wurden, ist so zu verstehen, daß die Schutzstoffe verdünnt und nicht wieder neu synthetisiert wurden, während die durch eine "Alterung" der Zellen oder ähnliches bedingten Vorgänge schon abgeschlossen waren und daher die D_{37} nicht mehr weiter beeinflussten. Da die Bakterien bei aerobem Wachstum eine um etwa einen Faktor 10 größere Konzentration erreichen als in der praktisch anaerob gewachsenen Vorkultur, so war auch die Zahl der Bakterien, die in das Medium ohne Glucose eingebracht wurden, ungefähr um den gleichen Faktor größer als die Zahl der normalerweise in das C-Medium eingepflichten Bakterien. Die gefundene D_{37} entspricht unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen fast genau der D_{37} , die man auf der Kurve bei der zugehörigen größeren Bakterienzahl findet.

Es sprechen auch andere Ergebnisse für die Existenz von solchen Stoffwechselprodukten, die als Strahlenschutzstoffe wirken. Hollaender (51) (in: Nickson(86)), Hollaender et al. (53), Stapleton (105), Stapleton et al. (109, 110) und Kelner et al. (68) fanden eine ganze Reihe von Strahlenschutzsubstanzen, die auch im Stoffwechsel der Organismen vorkommen. Insbesondere stellte Stapleton (105) fest, daß Hefeextrakt und wässrige Extrakte von verschiedenen Geweben eine deutliche Strahlenschutzwirkung auf Bakterien ausüben; die Überlebensrate hing von der Konzentration des Extrakts ab. Für einen Vergleich mit der Änderung der D_{37} ist allerdings die Angabe, daß die Überlebensrate bis um einen Faktor 100 erhöht werden konnte, recht zwecklos, da Stapleton die benutzte Dosis und die Absolutzahl der Überlebenden nicht angibt.

Stapleton versuchte dann, die Natur der Schutzstoffe festzustellen. Er fand, daß ein Gemisch aus vier bestimmten Aminosäuren eine gewisse Schutzwirkung zeigte, aber nicht so stark wie die natürlichen Extrakte. Wurde zu den Aminosäuren noch ein Gemisch aus Purin- und Pyrimidinbasen zugefügt, so wurde die Wirkung gesteigert. Vitamine und Wachstumsstoffe hatten keine Wirkung. Bei dem Versuch, die Extrakte zu reinigen und die wirksamen Substanzen zu isolieren, fand Stapleton ebenfalls, daß es sich um einen ganzen Komplex von zusammenwirkenden Komponenten handelt, die er aber nicht alle identifizieren konnte.

Aminosäuren wie auch Purin- und Pyrimidinbasen können auch in gewissem Maß aus der intakten Zelle an das umgebende Medium abgegeben werden (Loofbourow (80), Loofbourow et al. (81)). Sie besitzen also die geforderte Eigenschaft, welche zur Erklärung des Verlaufs der D_{37} nötig ist. Damit ist natürlich nicht gesagt, daß sie die einzigen vorkommenden Schutzsubstanzen wären.

Die Wirkung der Schutzsubstanzen kann einfach über eine Änderung der "wirksamen Dosis" erfolgen, d.h. sie fangen Radikale oder andere Bestrahlungsprodukte weg, oder sie verhindern von vornherein die Bildung bestimmter schädlicher Bestrahlungsprodukte. Es kann jedoch auch an eine gewisse Wirkung über eine Art Erholungsmechanismus gedacht werden. Purine und Pyrimidine sind wichtige Bestandteile der Nukleinsäuren, und man könnte

sich vorstellen, daß ein geschädigtes Nukleinsäuremolekül wieder repariert werden kann, wenn der nötige Ersatzbaustein vorhanden ist, daß eine solche Erholung jedoch nicht möglich ist, wenn der Baustein erst im Laufe von Stoffwechselprozessen neu synthetisiert werden muß. Auch dieser Vorgang ließe sich formal als Verringerung der "wirksamen Dosis" beschreiben, da hierbei ein Teil der Strahlenwirkung rückgängig gemacht würde.

Das abweichende Verhalten der D_{37} in Nutrient Broth dürfte wohl auf die komplizierteren Verhältnisse in diesem komplexen natürlichen Medium zurückzuführen sein. Eine genauere Untersuchung darüber wurde nicht angestellt.

3) Wachstum in flüssigem Nährmedium nach der Bestrahlung.

Der Einfluß der Röntgenbestrahlung auf die Dauer der lag-Phase und die Verdopplungszeit wurde bereits in den "Ergebnissen" kurz besprochen. Die Feststellung von Alper (3), daß schon kleine Dosen bis herab zu 300 r die lag-Phase von E. coli B verlängern, konnte qualitativ bestätigt werden, ja es deutet sich sogar schon eine Beeinflussung durch nur 60 r an, eine Dosis, bei der etwa 95 % der Bakterien überleben. Eine quantitative Übereinstimmung mit Alper war nicht möglich, da die Meßmethode sowie die Kulturbedingungen andere waren. Eine Verkürzung der Verdopplungszeit nach Bestrahlung, wie sie Alper gefunden hatte, wurde nur andeutungsweise bei den 1 : 100 mit Nutrient Broth verdünnten Bakterien beobachtet, und hier liegt der Effekt noch innerhalb der Fehlergrenzen der Messung. In allen anderen Fällen wurde die Verdopplungszeit bei bestrahlten und unbestrahlten Bakterien gleich gefunden, oder bei den bestrahlten geringfügig verlängert, wobei die Verlängerung wieder praktisch innerhalb der Fehlergrenzen der Messung (± 5 min) blieb. Der Unterschied kann daher rühren, daß bei den vorliegenden Versuchen immer Bakterien aus der stationären Phase für die Bestrahlung verwendet wurden, während Alper eine Verkürzung der Generationszeit hauptsächlich nach Bestrahlung von Bakterien aus der lag-Phase beobachtete (eine Verkürzung auf die Hälfte bei Bestrahlung mit 3000 rad). Außerdem kann das unterschiedliche Nährmedium (C-Medium sowie Nutrient Broth + 0,5 % NaCl gegenüber Nutrient Broth ohne Zusätze bei Alper) und die unterschiedliche Verdünnung das Ergebnis beeinflussen haben. Die Verdünnung der Bakterien war hier 1 : 10 und 1 : 100 gegenüber mindestens 1 : 10^3 bei Alper; der Verdünnungsfaktor ist nicht angegeben, doch sind die Wachstumskurven nach 2 - 3 Dekaden noch exponentiell.

Wie bereits erwähnt, läßt sich die unveränderte Generationszeit bei den bestrahlten Bakterien so verstehen, daß sich die koloniebildungsfähigen Bakterien in ganz normaler Weise vermehren. Eine Verkürzung der Generationszeit nach Bestrahlung erscheint dagegen nicht ohne weiteres verständlich, Alper gibt auch keine Erklärung dafür an, sondern zieht nur den Analogieschluß zum Verhalten der Bakterien nach einem Kälteschock. Inwiefern ihre Befunde überhaupt statistisch gesichert sind, läßt sich schwer beurteilen, da sie keine Fehlergrenzen angibt.

Interessant ist der Einfluß der Bestrahlung auf den Endtiter der Bakterien, insbesondere bei Nährmedium, das mit Puffer verdünnt ist. Zunächst würde man doch wohl annehmen, daß die nicht vermehrungsfähigen Bakterien einfach unverändert liegenbleiben, sich vielleicht auch allmählich zersetzen, während die vermehrungsfähigen zum gleichen Endwert heranwachsen wie die unbestrahlten, da ja die vorhandene Nährstoffmenge die gleiche ist und der geringe Unterschied im Ausgangswert der Zahl lebender Bakterien bei einer Vermehrung um den Faktor 10 keine Rolle spielt. Gibt man z.B. in 20 ml Puffer einmal 2 ml Bakteriensuspension und zum anderen 1 ml und dazu 1 ml durch Hitze abgetötete, so findet man in beiden Fällen genau denselben Endtiter (Abb. 34). Ein völlig anderes Ergebnis erhält man jedoch, wenn etwa die Hälfte der Bakterien nicht durch Hitze, sondern durch Röntgenstrahlung abgetötet ist: hier ist der Endtiter sehr deutlich herabgesetzt.

Zur Erklärung dieser Erscheinung kann man sich verschiedene Vorstellungen machen:

(1) Durch die Strahlung wird ein Teil der Nährstoffe zerstört, so daß für die bestrahlten Bakterien weniger zur Verfügung steht.

(2) Die Strahlung beeinflusst auch die vermehrungsfähigen Bakterien so, daß sie nicht mehr alle Bestandteile des Nährmediums ausnützen können.

(3) Die durch Strahlung "getöteten" Bakterien sind nicht wirklich tot, sondern nur vermehrungsunfähig; sie üben noch einen Stoffwechsel und üben so einen Einfluß auf das Nährmedium aus, indem sie Nährstoffe verbrauchen und/oder Inhibitorsubstanzen an das Medium abgeben.

(1) erscheint recht unwahrscheinlich, zum einen, weil das selbe Ergebnis gefunden wurde, wenn bestrahlte Bakterien in unbestrahlte oder zusätzlich bestrahlte Nutrient Broth gebracht wurden, zum anderen, weil die Änderung des Endtiters in Abhängigkeit von der Dosis eine sehr viel größere Streuung zeigt als in Abhängigkeit von der Zahl der strahleninaktivierten Bakterien.

Auch (2) verträgt sich nicht mit den Ergebnissen. Damit der Endtiter kleiner wird, müßten hier nämlich alle vorhandenen Bakterien unfähig geworden sein, einen oder mehrere bestimmte Bestandteile des Nährmediums auszunützen. Wären einige Bakterien übrig, welche noch das ganze Nährmedium ausnützen können, so

würden diese weiterwachsen und die ganze Kultur auf den Endtiter der unbestrahlten bringen. Für die Änderung des Endtiters mit der Dosis müßte man demnach eine Sprungfunktion erwarten, d.h. eine Mehrtrefferkurve mit äußerst hoher Trefferzahl, und nicht die gleichmäßige Abnahme, wie sie gefunden wurde.

Es ist damit natürlich nicht gesagt, daß (1) und (2) prinzipiell nicht vorkommt, nur sind diese Mechanismen hier nicht von wesentlicher Bedeutung.

Als die plausibelste Deutung für die Ergebnisse erscheint (3). Es ist durchaus bekannt, daß durch Strahlung "abgetötete" Organismen keineswegs sofort tot sind, sondern noch einen Stoffwechsel haben und auch andere Lebensäußerungen von sich geben können. So beobachteten Bruynoghe und Mund (16) bei der Bestrahlung von Mikroben mit Radium inaktivierte, also vermehrungsunfähige, aber bewegungsfähige Zellen. Inouye (65,66) und Rajewsky und Inouye (97) untersuchten den Stoffwechsel von Gewebe, das durch Röntgen- und α -Strahlen geschädigt war, und fanden auch bei hohen Dosen und längere Zeit nach der Bestrahlung noch etwa 10 % der Aktivität bei unbestrahltem Gewebe. Bonet-Maury et al. (14) stellten fest, daß durch Röntgenstrahlen und UV inaktivierte Bakterien noch atmen. Sie fanden weiterhin, daß das nicht der Fall ist bei Bakterien, die durch Hitze oder Chemikalien getötet wurden. Brandt et al. (15) beobachteten, daß 4850 r Röntgenstrahlung nur wenig Einfluß auf die Atmung von Hefe hatten, obwohl 90 % der Zellen keine Kolonien mehr bilden konnten. Billen et al. (12) untersuchten die Wirkung von Röntgenstrahlung auf E. coli. Sie beobachteten eine anfängliche Periode normaler Atmung, deren Dauer abhängig war vom Bakterienstamm und vom Substrat, aber praktisch unabhängig von der Dosis in dem gemessenen Bereich. Bei E. coli B/r war sie auf Pyruvat und Succinat länger als auf Glucose, bei E. coli, Texas-Stamm, wurde dagegen normale Atmung nur auf Glucose gefunden, auf Pyruvat wurde sie bei bestrahlten Bakterien sofort gehemmt. Die angewendeten Dosen waren 5000 - 90000 r, die Dauer der normalen Atmung lag in der Größenordnung von 1 Stunde. Ebenso stellte Hagen (43) fest, daß der Elektronentransport in der Atmungsfermentkette von E. coli B durch Bestrahlung bis zu 30000 r nicht gestört wird. Pauly (88, 89) untersuchte verschiedene Bakterienarten und fand überall, daß

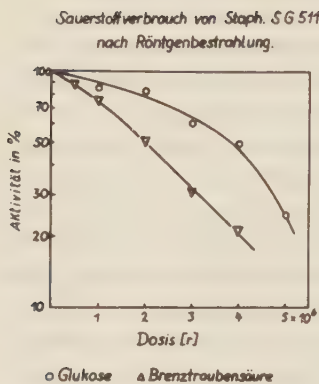
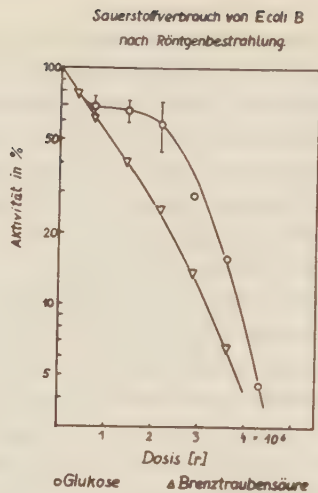
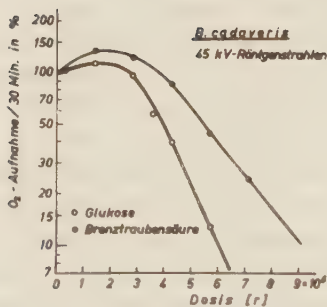


Abb. 38. a.



b.



0,1 mMol in 3 ml M/15 Phosphat-Puffer,
pH 6,8; 30°C; Luft; KOH im Einsatz.

38. c.

Abb. 38 a und b aus :

Pauly, Dissertation 1957

Abb. 38 c aus :

Pauly, Habilitationsschrift
(1959)

der Stoffwechsel bis zu einer Bestrahlung mit mehreren Mr in derselben Größenordnung bleibt wie bei unbestrahlten (Abb. 38 a - c). Dabei wurde die Sauerstoffaufnahme während der ersten 30 min. nach der Bestrahlung gemessen.

Auch eine Abgabe verschiedenster Substanzen aus bestrahlten Zellen ist bekannt. Herdic (46) beobachtete ein Austreten von Giftstoffen aus Pflanzenzellen nach α - Bestrahlung. Wenn nur ein engbegrenztes Gebiet einer Pflanze bestrahlt wurde, so waren nach einiger Zeit auch die Zellen in der Umgebung geschädigt. Webb und Loofbourow (115), Loofbourow (80) sowie Loofbourow et al. (81) untersuchten die Abgabe einer großen Zahl von Substanzen aus UV-bestrahlten Hefezellen an das umgebende Medium. Die Hefezellen waren in destilliertem Wasser suspendiert, ein Teil wurde 8 Stunden mit UV bestrahlt, insgesamt $4,2 \cdot 10^8$ erg/ml, der andere Teil blieb unbestrahlt, wurde aber sonst ganz gleich behandelt. Die Temperatur war 22 - 23 ° C. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand untersucht. Bei den bestrahlten Zellen war darin insgesamt 21,5 mal soviel feste Substanz gelöst wie bei den unbestrahlten, die Menge der einzelnen Komponenten schwankte zwischen 2 - 100 mal so viel wie bei den unbestrahlten. Untersucht wurde die Abgabe von Faktoren des Vitamin B-Komplexes, Aminosäuren, Nukleotiden und Nukleosiden. Wurde der Überstand verdünnt und einem passenden Medium beigegeben, so wurde eine Wachstumsförderung der Hefe beobachtet. Das beweist jedoch nicht, daß nicht durch eine höhere Konzentration der erwähnten Substanzen eine Vermehrungshemmung der Hefe eintreten könnte. Bei E. coli B beobachteten Billen et al. (11) eine Abgabe von Adenosintriphosphat aus röntgenbestrahlten Zellen, während unbestrahlte Zellen praktisch kein ATP an das Medium abgaben.

Es steht also fest, daß durch Strahlung inaktivierte Bakterien

- 1) einen Teil der Nährstoffe im Medium veratmen, da sie noch einen Stoffwechsel besitzen, der in derselben Größenordnung liegt wie bei den unbestrahlten,
- 2) eine ganze Reihe von Stoffen in das Medium abgeben können, und zwar in viel größerer Konzentration als unbestrahlte. Darunter dürften auch solche sein, die in entsprechender Konzentration eine weitere Vermehrung der Bakterien hemmen. Es erhebt

sich nun die Frage, welcher der beiden Mechanismen für die Verminderung des Endtiters bei den bestrahlten E. coli B verantwortlich war.

Hinshelwood (47) leitete für den Fall, daß die Nährstoffkonzentration im Medium der limitierende Faktor für die Bakterienvermehrung ist, eine Beziehung ab zwischen Nährstoffkonzentration und Endtiter und fand, daß dieser der Ausgangskonzentration des Nährstoffs proportional sein sollte.

Abb. 26 zeigt, daß der Endtiter der Konzentration der Nutrient Broth nicht völlig proportional war, sondern etwas langsamer anstieg. Das kann jedoch daher kommen, daß das Medium nicht einfach mit Wasser verdünnt wurde, sondern zur Aufrechterhaltung einigermaßen konstanter osmotischer Bedingungen mit M/50 - Phosphatpuffer + 0,5 % NaCl. Das Verhältnis Salz : Nutrient Broth war also umso höher, je stärker verdünnt wurde. Da auch Salze im Leben der Zelle notwendig sind, muß man vielleicht bei der verdünnten Nutrient Broth mit einer höheren "Nährstoffkonzentration" rechnen, als der Konzentration der Nutrient Broth entspricht. Das würde die verhältnismäßig geringfügige Abweichung von der Proportionalität völlig erklären. Auch das Absinken des Endtiters bei normal konzentrierter Nutrient Broth läßt sich dadurch verstehen, daß der Nutrient Broth zwar 0,5 % NaCl zugesetzt war, aber kein Phosphat.

Bei höheren Nährstoffkonzentrationen, bei denen unabhängig von der Konzentration der Endtiter der Bakterien konstant bleibt, nimmt Hinshelwood mit anderen Autoren an, daß toxische Produkte, welche aus den Zellen an das Medium abgegeben werden, für das Aufhören der Vermehrung verantwortlich sind.

Man sieht nun, daß bei der angewendeten Verdünnung: 1 Teil Bakteriensuspension + 10 Teile Puffer, gerade das Grenzgebiet zwischen Zunahme des Endtiters mit der Konzentration und Konstanzbereich des Endtiters erreicht ist. Auch aus Abb. 34 entnimmt man, daß der Endtiter sich gerade um einen Faktor 2 unterscheidet, wenn 1 bzw. 2 ml Nutrient Broth in 20 ml Puffer gegeben werden, daß er aber bei 3 ml Nutrient Broth in derselben Menge Puffer nur noch geringfügig ansteigt.

Man kann also in erster Näherung annehmen, daß bei der verwendeten Verdünnung der Endtiter proportional zur verfügbaren Nährstoffmenge ist, und die von Hinshelwood aufgestellte Be-

ziehung läßt sich nun verallgemeinern für den Fall, daß in der Bakterienpopulation durch Strahlung inaktivierte Bakterien sind, deren Zahl konstant bleibt, die aber Nährstoffe verbrauchen.

Es sei

A_0 = Gesamtzahl der Bakterien/ml zur Zeit $t = 0$

A = Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien/ml zur Zeit $t = 0$

$A' = a \cdot A_0$ = Zahl der inaktivierten Bakterien/ml

E_0 = Endtiter einer unbestrahlten Bakterienkultur ($a = 0$)

E = " " bestrahlten " ($a \neq 0$)

$n(t)$ = Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien zur Zeit t

c_0 = Konzentration des Nährmediums zur Zeit $t = 0$

$c(t)$ = " " " " " " t

f = mittlerer Verbrauch pro Bakterium und Zeiteinheit bei ungeschädigten Bakterien

f' = dasselbe bei inaktivierten Bakterien

τ = Zeit des Eintritts in die stationäre Phase ($c = 0$)

$\tau \cdot \ln 2$ = Verdopplungszeit (Generationszeit)

Dann kann man ansetzen:

$$c(t) = c_0 - f \int_0^t n(t) dt - f' \int_0^t A' dt$$

Dabei ist $n(t) = A e^{t/\tau}$; $A' = \text{const.}$

Wenn der Wert $c = 0$ erreicht ist ($t = T$), wird das Wachstum eingestellt, es gilt dann

$$c_0 = f \int_0^T A e^{t/\tau} dt + f' \int_0^T A' dt$$

$$c_0 = f \cdot \tau \cdot A (e^{T/\tau} - 1) + f' \cdot A' \cdot T$$

Nun ist aber $A e^{T/\tau} = E$

Daraus folgt $T = \tau \ln (E/A)$

Bei den Versuchen war $e^{T/\tau} \approx 10$, man kann daher die 1 vernachlässigen und erhält:

$$c_0 = f \cdot \tau \cdot E + f' \cdot \tau \cdot A' \ln(E/A)$$

Die Gleichung wird nun umgeordnet:

$$E = \frac{c_0}{f \cdot \tau} - \frac{f'}{f} \cdot A' \ln (E/A)$$

Das ist zwar keine exakte Auflösung der Gleichung, da E noch auf der rechten Seite vorkommt, doch kann der Logarithmus als langsam veränderliche Funktion näherungsweise als konstant angesehen werden. Weiterhin ist für $A' = 0$

$$E = c_0 / f \cdot \tau = E_0$$

außerdem war

$$A' = a \cdot A_0$$

Setzt man das alles ein, so erhält man

$$E = E_0 (1 - \alpha a) \quad (*)$$

genau den Zusammenhang, der experimentell gefunden wurde.

Dabei ist

$$\alpha = \frac{f'}{f} \frac{A_0}{E_0} \ln \frac{E}{A}$$

Zur Überprüfung der Annahme, daß die Verminderung des Endtiters durch einen Nahrungsverbrauch der inaktivierten Bakterien bedingt ist, kann man nun die Verbrauchsrate f und f' der normalen und der inaktivierten Bakterien vergleichen. Es wurde experimentell gefunden:

$$\alpha = 0,5 ; A_0/E_0 = 0,05 ; \ln (E/A) = 3,2 \text{ bis } 3,5$$

Daraus folgt

$$f'/f \approx \frac{0,5}{0,05 \cdot 3,3} = 3$$

Das würde bedeuten, daß die inaktivierten Bakterien einen dreimal so hohen Nahrungsverbrauch hatten wie die normalen. Dieser Wert erscheint etwas hoch, auch wenn man zuläßt, daß die Zahl der Inaktivierten nicht völlig konstant bleibt, sondern ein gewisser Prozentsatz sich noch einmal teilt. Denn in allen bekannten Fällen wurde bei bestrahlten Mikroorganismen eine Atmungsaktivität ungefähr in der Größe der Aktivität bei unbestrahlten gefunden, aber nicht wesentlich größer; außerdem nahm sie mit der Zeit ab. (Nach etwa einer Stunde, Billen et al. (12), während das Wachstum der Bakterien ungefähr fünf Stunden dauerte).

Man muß also annehmen, daß in diesem Konzentrationsbereich vielleicht auch eine Abgabe vermehrungshemmender Substanzen aus den bestrahlten Bakterien einen Einfluß auf die Herabsetzung des Endtiters hat. Auch hierfür läßt sich ein theoretischer Ansatz machen:

Von jedem vermehrungsfähigen Bakterium mögen c Moleküle einer Inhibitorsubstanz an das Medium abgegeben werden. Bei durch Strahlung inaktivierten Bakterien seien es c' . Die Vermehrung werde eingestellt, wenn die Gesamtkonzentration den Wert $C = c \cdot E_0$ erreicht hat. Sind $A' = a \cdot A_0$ inaktivierte Bakterien vorhanden, so geschieht das bei einem Endtiter E und es gilt

$$c \cdot E_0 = c E + c' A' = c E + c' A_0 \cdot a$$

$$E = E_0 \left(1 - \frac{c'}{c} \frac{A_0}{E_0} \cdot a \right)$$

Also wieder eine Beziehung der Form

$$E = E_0 (1 - \alpha a)$$

diesmal sogar exakt. Aus dem experimentellen Wert $\alpha = 0,5$ und $A_0/E_0 = 0,05$ berechnet man

$$c'/c = 0,5/0,05 = 10$$

Berücksichtigt man die erwähnten Ergebnisse von Loofbourow und Mitarbeitern bei Hefe, so erscheint eine Abgabe von 10 mal mehr Inhibitorsubstanz durch die bestrahlten als durch die unbestrahlten Bakterien durchaus möglich.

Wenn die Vermehrung der Bakterien nicht durch Nahrungsmangel begrenzt wird, sondern durch das Auftreten von hemmenden Stoffwechselprodukten, so beobachtet man, daß die Vermehrung nicht fast schlagartig aufhört wie beim Nahrungsmangel, sondern die Wachstumskurve wird allmählich flacher, bis sie den stationären Wert erreicht. Das wurde bei unbestrahlten Bakterien, die in normal konzentrierter Nutrient Broth wuchsen, festgestellt, und ebenso ist es deutlich in Abb. 28 bei den mit 1800 r bestrahlten, in verdünnter Nutrient Broth gewachsenen Bakterien zu erkennen.

Um den Einfluß der beiden Faktoren: Nahrungsverbrauch und Abgabe von Hemmstoffen durch die strahleninaktivierten Bakterien auf den Endtiter abschätzen zu können, muß man sie unter Bedingungen untersuchen, wo einer der beiden Faktoren fehlt. So ist beim Wachstum in normal konzentrierter Nutrient broth Nahrung im Überschuß vorhanden, so daß ein Nährstoffverbrauch durch die inaktivierten Bakterien nicht ins Gewicht fallen wird. Hier wurden jedoch sehr große Schwankungen in der Kolonienzahl gefunden, die wohl daher kommen, daß durch die Abgabe verschiedenster Substanzen durch die inaktivierten Bakterien bei dem reichen Nahrungsangebot eine Art instabiler Zustand in der Kultur entsteht, wobei das Wachstum erst gefördert und dann wieder gehemmt wird und schließlich ein Teil der Bakterien abstirbt. Genaue Messungen sind hierbei jedoch nicht möglich.

Anders liegen die Dinge bei den Bakterien, die im Verhältnis $1 : 11^4$ mit Puffer verdünnt wurden. Die unbestrahlten Bakterien vermehren sich dabei ungefähr um einen Faktor 50. Die Konzentration von etwa zugegebenen Hemmstoffen wird hier so gering bleiben, daß sie keine Rolle spielt.

Aus dem Beginn der Kurve in Abb. 30 entnimmt man, unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen:

$$\alpha = 0,20 \pm 0,06 ; \text{ außerdem war } A_0/E_0 = 0,02 ; \quad \ln A/A = 4,2$$

$$\text{Daraus berechnet man } f'/f = 2,4 \pm 0,7$$

Dieses Ergebnis scheint zunächst zu bestätigen, daß sich die durch Strahlung inaktivierten Bakterien in diesem Dosisbereich im Mittel noch 1 - 2 mal teilen, bzw. zu fadenförmigen Geoiden auswachsen, die dann entsprechend mehr Nahrung benötigen. Doch ist dabei zu berücksichtigen, daß die stark verdünnten Bakterien nicht in dünner Schicht in einem Erlenmeyerkolben, also praktisch aerob, gewachsen waren, sondern im Reagenzglas ohne zuzätzliche Luftzufuhr. Zwar kann man bei diesen sehr stark verdünnten Bakterien nicht unbedingt von "praktisch anaerobem Wachstum" sprechen, da in der Lösung ein gewisser Sauerstoffvorrat war, doch zeigt ein Vergleich mit Abb. 33, daß die Wachstumsgeschwindigkeit der bestrahlten Bakterien durch Sauerstoffmangel stärker verlangsamt wird als die der unbestrahlten. So ist es möglich, daß die bestrahlten Bakterien nach 20 Stunden

Inkubationszeit ihren stationären Endwert noch nicht ganz erreicht hatten. Für $E/E_0 = 98 \%$ statt, wie beobachtet, 95% , wäre aber bereits $f'/f = 1$, eine Vermehrung der inaktivierten Bakterien zur Erklärung des Effekts also nicht nötig.

Da hier ohnehin f'/f etwas niedriger gefunden wurde als bei den 1 : 11 verdünnten Bakterien, so läßt sich also keinesfalls ausschließen, daß bei diesen auch eine Abgabe von Hemmstoffen beteiligt war. Man kann abschätzen, daß der Einfluß der Hemmstoffe auf den Endtiter kleiner oder ungefähr gleich demjenigen des Nahrungsverbrauchs war, aber nicht wesentlich größer.

Anhand der Gleichung (2), Seite 82, wobei der vollständige Ausdruck für α eingesetzt ist, kann man auch eine Aussage über das Verhalten des Endtiters bei sehr hohen Inaktivierungsraten machen, also wenn $a \rightarrow 1$. Dabei geht $A \rightarrow 0$, und da E nicht negativ werden kann, der ganze Ausdruck $\alpha \cdot a$ also stets kleiner als 1 bleiben muß, so muß auch $E \rightarrow 0$ gehen.

Berechnet man E/E_0 für verschiedene Werte von a, wobei man $f'/f = 3$ und $E_0/A_0 = 20$ einsetzt, so stellt man fest, daß die Kurve bis $a = 60 \%$ praktisch linear verläuft, mit einer Steigung, die $\alpha = 0,5$ entspricht. Für $a = 70 \%$ weicht die berechnete Kurve etwas nach unten ab, sie liegt aber gerade noch innerhalb der Fehlergrenzen der gemessenen Werte. Deutliche Abweichungen von der Linearität findet man erst oberhalb von $a = 80 - 90 \%$, hier liegen aber keine Messungen mehr vor.

Setzt man bei der Berechnung der Kurve $f'/f = 2$ oder $= 1$, so findet man in beiden Fällen für die Differenz

$$(E/E_0)_{\text{theoret.}} - (E/E_0)_{\text{exper.}}$$

eine innerhalb der Fehlergrenzen lineare Funktion, die man als den Anteil ansehen kann, um den der Endtiter durch den Einfluß von Hemmstoffen verändert wird. Da die Funktion aber in beiden Fällen linear verläuft, läßt sich auch auf diese Weise nicht entscheiden, welcher Wert von f'/f nun tatsächlich der richtige ist.

Für die 1:11⁴ verdünnten Bakterien läßt sich keine derartige theoretische Kurve berechnen; setzt man $f'/f = 2,4$, so daß die Kurve durch den Punkt bei $a = 25 \%$ geht, so liegt der Punkt bei $a = 54 \%$ weit unterhalb der Kurve. Das spricht ebenfalls dafür,

daß hier der stationäre Endwert des Titers noch nicht erreicht war, wobei die stärker bestrahlten Bakterien in ihrem Wachstum noch weiter zurück waren als die schwächer bestrahlten. Außerdem ist es möglich, daß hier noch die Dauer der lag-Phase zu berücksichtigen wäre, die im allgemeinen um so größer ist, je stärker die Bakterien verdünnt werden, die hier aber nicht gemessen war.

Zum Schluß bleibt noch das Ergebnis bei den anaerob gewachsenen, mit 1800 r bestrahlten Bakterien zu besprechen. Die Bakterien waren nur "praktisch anaerob" gewachsen, d.h. die Suspension befand sich in einem Reagenzglas, eine Oberfläche von etwa 1 cm² grenzte an Luft, und eine dünne Schicht des Nährmediums unter dieser Oberfläche enthielt daher auch Sauerstoff gelöst. Nimmt man an, daß sich nur die praktisch konstante Zahl von Bakterien in dieser dünnen Schicht vermehren konnte, während die nachgewachsenen Bakterien in tiefere Schichten ohne Sauerstoff absanken und dort die Vermehrung einstellten, so ist eine Zunahme der Bakterienzahl proportional zur Inkubationszeit zu erwarten - gerade das, was bei den mit 1800 r bestrahlten Bakterien beobachtet wurde. Da bei den unbestrahlten keine Zunahme des Titers proportional zur Inkubationszeit gefunden wurde, sondern eine anfängliche exponentielle Wachstumsphase und dann eine stationäre Phase, so ist daraus zu schließen, daß die unbestrahlten ~~ten~~ Bakterien zu anaerobem Wachstum befähigt waren, die mit 1800 r bestrahlten aber nicht mehr - wenigstens der größte Teil, und unter den vorliegenden Versuchsbedingungen, nämlich mit Phosphatpuffer verdünnte Nutrient Broth, die durch die Vorkultur zu etwa 1/10 aufgebraucht war, als Nährmedium.

Das braucht nicht zu bedeuten, daß der Stoffwechsel der bestrahlten Bakterien völlig umgestellt ist, was auch bei der verhältnismäßig geringen Dosis von 1800 r recht unwahrscheinlich wäre, sondern es kann sich um einen indirekten Effekt handeln, hervorgerufen durch die Abgabe der verschiedenartigsten Substanzen aus den bestrahlten Zellen, wie den erwähnten Nukleotiden, Nukleosiden und Adenosintri-phosphat.

Zusammenfassung.

=====

1) Bei Röntgenbestrahlung von *E. coli* B unter verschiedenen Versuchsbedingungen konnte keine kleinste biologisch wirksame Dosis festgestellt werden, vielmehr verlief in allen untersuchten Fällen die Dosiseffektkurve rein exponentiell bis herunter zu 60 r, bei einer Meßgenauigkeit von $\pm 3\%$. Abweichende Ergebnisse anderer Autoren werden diskutiert.

Die Möglichkeit, diese exponentiellen Dosiseffektkurven durch die Annahme einer Mischpopulation aus Ein- und Mehrtrefferobjekten zu erklären, wird ausführlich behandelt, und es wird an Hand der erreichten Meßgenauigkeit nachgewiesen, daß mindestens etwa 80 % Eintrefferobjekte in der Population vorhanden sein müssen, wenn man nicht sehr unwahrscheinliche Annahmen über die Empfindlichkeitsverteilung machen will.

2) Die Strahlenempfindlichkeit der Bakterien in Abhängigkeit von ihrem Kulturalter zeigt einen unterschiedlichen Verlauf je nach dem Nährmedium, in dem die Bakterien gewachsen sind. Dieser läßt sich am besten deuten als Änderung der "wirksamen Dosis" durch Stoffwechselprodukte der Zellen. Ein zusätzlicher Einfluß des Sauerstoffpartialdrucks während der Bestrahlung auf die Strahlenempfindlichkeit der Bakterien wird bestätigt. Die Form der Dosiseffektkurven war in allen Fällen exponentiell.

3) Der Endtiter, den eine bestrahlte Bakterienkultur beim Wachstum in flüssigem Nährmedium unter aeroben Wachstumsbedingungen erreichen kann, ist abhängig von der Zahl der durch die Strahlung inaktivierten Bakterien in der Kultur. Es wird gezeigt, daß dafür ein Nährstoffverbrauch wie auch eine Abgabe vermehrungshemmender Substanzen durch die inaktivierten Bakterien verantwortlich zu machen ist.

Unter "praktisch anaeroben" Wachstumsbedingungen kann man aus der Form der Wachstumskurve schließen, daß mit 1800 r bestrahlte Bakterien in ihrer Fähigkeit zu streng anaerobem Wachstum stark geschädigt sind, während die Vermehrungsrate der überlebenden Zellen unter aeroben Bedingungen praktisch die gleiche ist wie bei unbestrahlten.

Literatur.
=====

- (1) Adler, H.I., and Engel, M.S. : Factors influencing the survival of bacteria after exposure to ionizing radiations. J. Zell. Comp. Physiol. 53 Suppl. 1 (1951) 95 - 105
- (2) Alper, .. : the modification of damage caused by primary ionization of biological targets. Rad. Res. 5 (1955) 573 - 585
- (3) Alper, .. : Observations on bacterial growth and morphology shortly after irradiation. Vortrag Radiologenkongress Stockholm 1956
- (4) Anderson, E.H. : Heat reactivation of ultraviolet-inactivated bacteria. J. Bact. 51 (1951) 389 - 394
- (5) Anderson, E.H. : The effect of oxygen on mutation induction by x-rays. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 37 (1951) 340 - 349
- (6) Anderson, R.S., and Turkowitz, H. : The experimental modification of the sensitivity of yeast to roentgenrays. Am. J. Roent. 46 (1941) 537 - 542
- (7) Atwood, K.C., and Stapleton, G.E. : Lethal mutations and the bactericidal action of ionizing radiation. Naturwiss. 39 (1952) 330 - 331
- (8) Barron, E.S.G. : The effect of ionizing radiations on some systems of biological importance. in: Nickson, Symposium on radiobiology (1952) Chap. 12, S. 216 - 240
- (9) Barron, E.S.G. : The effect of x rays on systems of biological importance. In: Hollaender, Radiation biology, Vol. I (1954) Chap. 5, S. 283-314
- (10) Biagini, C. : Studies in the mode of action of ionizing radiations. Influence of the cell concentration on lethal effects of x-rays on Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys. 56 (1955) 38 - 44

- (11) Willen, D., Strehler, S.L., Stapleton, G.E., and Brigham, E.:
Postirradiation release of adenosine triphosphate from *Escherichia coli* s/r.
Arch. Biochem. Biophys. 43 (1953) 1 - 10
- (12) Willen, D., Stapleton, G.E., and Hollaender, A.: The effect of x radiation on the respiration of *Escherichia coli*. *J. Bact.* 65 (1953) 131 - 135
- (13) Blau, M., und Altmann, K.: Über einige Wirkungen von Strahlen. II. *Zs. f. Physik* 12 (1923) 315 - 329
- (14) Monet-Laury, P., Perault, R., et Richsen, M.L.: L'action bactériostatique des rayons x et ultra-violets. *Ann. Inst. Pasteur* 70 (1944) 250 - 252
- (15) Brandt, J.E., Freeman, P.J., and Swenson, P.A.: The effect of radiations on galactozymase formation in yeast. *Science* 113 (1951) 383 - 384
- (16) Bruynoghe, R., et Lund, W.: L'action du radium sur les microbes. *C. R. Soc. Biol. Paris* 92 (1925) 211 - 213
- (17) Burnett, W.T. jr., Morse, M.L., Burke, A.W., and Hollaender, A.: Reduction of the x-ray sensitivity of *Escherichia coli* by sodium hydrosulfite and certain other inorganic sulfur compounds. *J. Bact.* 63 (1952) 591 - 595
- (18) Caspersson, T.: Cell growth and cell function. W.W. Norton, New York, 1950
- (19) Crowther, J.A.: Some considerations relative to the action of x-rays on tissue cells. *Proc. Roy. Soc. B* 96 (1924) 207 - 211
- (20) Crowther, J.A.: The action of x-rays on *Colpidium colpoda*. *Proc. Roy. Soc. B* 100 (1926) 390 - 404
- (21) Crowther, J.A.: A theory of the action of x-rays on living cells. *Proc. Camb. Phil. Soc.* 23 (1927) 284

- (22) Dänzer, H. : Über einige Wirkungen von Strahlen. VII. Eine Erweiterung der statistischen Theorie der biologischen Strahlenwirkungen. 2. Teil. Zs. f. Physik 89 (1934) 421 - 425
- (23) Dale, W.M. : Basic radiation biochemistry. In: Hillaender, Radiation biology, Vol. I (1954) Chap. 4, S. 255 - 281
- (24) Dale, W.M., Gray, L.H., and Meredith, W.J. : The inactivation of an enzyme (carboxypeptidase) by x and α radiation. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. A 242 (1949) 33 - 62
- (25) Dessauer, F. : Über einige Wirkungen von Strahlen. I. Zs. f. Physik 12 (1923) 38 - 47
- (26) Dessauer, F. : 10 Jahre Forschung auf dem physikalisch-medizinischen Grenzgebiet. Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1931
- (27) Dessauer, F. : Untersuchungen über das Grundproblem der biologischen Strahlenwirkungen. I. Problemstellung und Theorie. In: Dessauer, 10 Jahre Forschung, S. 176 - 201
- (28) Dittrich, W. : Treffermischkurven. Zs. f. Naturf. 15 b (1960) 261 - 266
- (29) Engelhard, H., und Houtermans, T. : Über die Einwirkung von α - Strahlen und ultraviolettem Licht auf bact. coli. Zs. f. Naturf. 5 b (1950) 264-269
- (30) Engelhard, H., und Houtermans, T. : Einfluß der Wachstumsbedingungen auf die "Tötung" von bact. coli durch UV-Licht und Kritik des Eintreffermodells. Naturw. 39 (1952) 161 - 162
- (31) Erdmann, K. : Über eine Ursache der Hemmung der Zellteilung durch Röntgenstrahlen. Pflügers Archiv 235 (1935) 470 - 485
- (32) Erdmann, K. : Untersuchungen über die Abhängigkeit der Röntgenstrahlenwirkung vom Wassergehalt des Protoplasmas. Protoplasma 26 (1936) 557-576

- (33) Giles, N.H.jr. : Recent evidence on the mechanisms of chromosome aberration production by ionizing radiations. In: Nickson, Symposium on radiobiology (1952) Chap. 15, S.267-284
- (34) Glocker, R. : Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Zelle als physikalisches Problem. Festschrift zur Jahrhundertfeier der Techn. Hochschule Stuttgart; Berlin 1929, S. 109
- (35) Glocker, R. : Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Zelle als physikalisches Problem. Strahlenther. 33 (1929) 199 - 205
- (36) Glocker, R. : Quantenphysik der biologischen Röntgenstrahlenwirkung. Zs. f. Physik 77 (1932) 553 - 675
- (37) Gray, L.H. : The initiation and development of cellular damage by ionizing radiations. Brit. J. Rad. 26 (1953) 609 - 618
- (38) Gray, L.H. : Some characteristics of biological damage induced by ionizing radiations. Rad. Res. 1 (1954) 189 - 213
- (39) Gray, L.H., Conger, A.D., Eoert, M., Hornsey, S., and Scott, O.C.A. : The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. Brit. J. Rad. 26 (1953) 638 - 648
- (40) Greve, E. : Die Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit einer Saccharomyces cerevisiae durch Stickstoff- und Glucosemangel. Zs. f. Naturf. 15 b (1960) 666 - 670
- (41) Greve, E. : Über den Einfluß verschiedener Kohlehydratquellen und der osmotischen Verhältnisse auf die Strahlenempfindlichkeit von Saccharomyces cerevisiae. Zs. f. Naturf. 16 b (1961) 589 - 594

- (42) Gunter, S.E., and Kohn, H.I. : Effect of x-rays on the survival of bacteria and yeast. II. Relation of cell concentration and endogenous respiration to sensitivity. J. Bact. 72 (1955) 422 - 428
- (43) Hagen, U. : Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Atmungsfermentkette. Naturwiss. 42 (1955) 185
- (44) Hall, T.A. : The interpretation of exponential dose-effect curves. Bull. Math. Biophys. 15 (1953) 43 - 47
- (45) Hayden, S., and Smith, L. : The relation of atmosphere to biological effects of x-rays. Genetics 34 (1949) 25 - 43
- (46) Herčík, F. : Über die Exsposition von Giftstoffen aus Pflanzenzellen nach α - Bestrahlung. Fund. radiol. 3 (1938) 185
- (47) Hinshelwood, C.N. : The chemical kinetics of the bacterial cell. Clarendon Press, Oxford, 1947
- (48) Hollaender, A. : Radiation biology. Vol. I: High energy radiation. Part I & II. McGraw-Hill, New York, Toronto, London, 1954
- (49) Hollaender, A. : Radiation biology. Vol. II: Ultraviolet and related radiations. McGraw-Hill, New York, Toronto, London, 1955
- (50) Hollaender, A. (Edit.) : Radiation protection and recovery. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1950
- (51) Hollaender, A. : Physical and chemical factors modifying the sensitivity of cells to high-energy and ultraviolet radiation. In: Nickson, Symposium on radiobiology (1952) Chap. 16, S. 285 - 295

- (52) Hollaender, A. : The effects of pre- and posttreatment on the radiation sensitivity of micro-organisms. Vortrag Radiologenkongress Stockholm 1956
- (53) Hollaender, A., Stapleton, G.E., and Burnett, W.T. jr. : Chemical aspects of radiation sensitivity on living cells. AECU - 1699 (1951)
- (54) Hollaender, A., Stapleton, G.E., and Martin, F.L. : X-ray sensitivity of *E. coli* as modified by oxygen tension. Nature 167 (1951) 103-104
- (55) Holweck, F. : Essai d'interprétation énergétique de l'action des rayons K de l'aluminium sur les microbes. C. R. Acad. Sci. 186 (1928) 1318 - 1319
- (56) Holweck, F. : Production de rayons X monochromatiques de grande longueur d'onde. Action quantique sur les microbes. C. R. Acad. Sci. 183 (1929) 197 - 199
- (57) Holweck, F. : Etude énergétique de l'action biologique de diverses radiations. C. R. Acad. Sci. 190 (1930) 527 - 529
- (58) Holweck, F., et Lacassagne, A. : Sur le mécanisme de l'action cytocaustique des radiations. C. R. soc. Biol. 103 (1930) 766 - 768
- (59) Houtermans, T. : Einfluß des Wachstumszustandes eines Bakteriums auf seine Strahlenempfindlichkeit. Zs. f. Naturf. 8 b (1953) 767 - 771
- (60) Houtermans, T. : Kritische Diskussion der Argumente für die Interpretation der Inaktivierung von Bakterien durch Strahlen als Eintreffervorgang. Strahlenther. 92 (1953) 423 - 436
- (61) Houtermans, T. : Über den Verlauf der Inaktivierungskurven für *Escherichia coli* bei sehr kleinen Bestrahlungsdosen. Strahlenther. 93 (1954) 130 - 137

- (62) Howard-Flanders, P., and Alper, J. : The sensitivity of microorganisms to irradiation under controlled gas conditions. Rad. Res. 7 (1957) 518 - 540
- (63) Howard-Flanders, P., and Moore, D. : The time interval after pulsed irradiation within which injury to bacteria ~~wan~~ be modified by dissolved oxygen. Rad. Res. 9 (1958) 422-437
- (64) Hutchinson, F. : The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell. Rad. Res. 7 (1957) 473 - 483
- (65) Inouye, K. : Der Stoffwechsel des ~~durch~~ Röntgenstrahlung geschädigten Gewebes. Klin. Wschr. 15 (1936) 613 - 614
- (66) Inouye, K. : Biologische Wirkungen von Alphastrahlen unter Berücksichtigung der Probleme der Radiumschwachtherapie. Strahlenther. 64 (1939) 175 - 200
- (67) Jordan, P. : Strahlenbiologie der Bakterien. Experiment und Theorie (Sammelreferat). Protoplasma 32 (1939) 464 - 480
- (68) Kelner, A., Bellamy, W.D., Stapleton, G.E., and Zelle, M.R. : Symposium on radiation effects on cells and bacteria. Bact. Rev. 19 (1955) 22-24
- (69) Klövekorn, H. : Die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf Bakterien. Strahlenther. 20 (1925) 354-377
- (70) Klövekorn, G.H., und Gaertner, O. : Die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf einzellige Lebewesen. Strahlenther. 23 (1926) 148 - 154

- (71) Kohn, H.I., and Gunter, S.E. : Relative biological efficiency of 1000 kvp and 250 kvcp x-rays. I. General introduction. Determinations based on the dose-survival curves of *Saccharomyces cerevisiae*, haploid and diploid.- II. Supplemental determinations based on the dose-survival curves of *Escherichia coli* and *Rhodospseudomonas spheroides*. *Rad. Res.* 5 (1956) 674 - 687; 688 - 692
- (72) Kopper, P.H. : Relationship of growth-phase to the reducing activity of bacterial cells. *Nature* 167 (1951) 951 - 952
- (73) Kopper, P.H. : Studies on bacterial reducing activity in relation to age of culture. *J. Bact.* 63 (1952) 639 - 645
- (74) Lacassagne, A. : Action des rayons K de l'aluminium sur quelques microbes. *C. R. Acad. Sci.* 186 (1928) 1316 - 1317
- (75) Lacassagne, A. : Action des rayons X de grande longueur d'onde sur les microbes. Etablissement de statistiques précises de la mortalité des bactéries irradiées. *C. R. Acad. Sci.* 188 (1929) 200 - 202
- (76) Lacassagne, A. : Différence de l'action biologique provoquée dans les levures par diverses radiations. *C. R. Acad. Sci.* 190 (1930) 524 - 526
- (77) Latarjet, R. : Some factors influencing cell radio-sensitivity by acting at the level of the primary biochemical action. In: Nickson, Symposium on radiobiology (1952), Chap. 13, S. 241 - 258
- (78) Lea, D.E. : Actions of radiations on living cells. Cambridge, University Press, 1955 (2.Aufl.)

- (79) Loiseleur, I. : L'intervention de l'oxygène en radio= Biologie. Ann. Inst. Pasteur 84 (1953) 1001 - 1009
- (80) Loofbourow, J.R. : Intercellular hormones. 7. Release of amino acids by damaged living yeast cells. Biochem. J. 41 (1947) 119 - 122
- (81) Loofbourow, J.R., Dossenheim-Erreira, S., Loofbourow, D.G., and Yeats, C.A. : Intercellular hormones. 8. Release of nucleotides and nucleosides by damaged living cells. Biochem. J. 41 (1947) 122 - 129
- (82) Luria, S. : Actions des radiations sur le bacterium coli. C.R. Acad. Sci. 209 (1939) 504-505
- (83) Malmgren, B., and Heden, C.G. : Studies on the nucleotide metabolism of bacteria. III. The nucleotide metabolism of the gram-negative bacteria. Acta Path. Microbiol. Scand. 24 (1947) 448 - 471
- (84) Mefferd, R.P., and Campoell, L.L.jr. : Influence of temperature upon radiation sensitivity of thermophilic and mesophilic bacteria. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 79 (1952) 12 - 16
- (85) Morse, M.L., and Carter, J.E. : The synthesis of nucleic acids in cultures of Escherichia coli, strains B and B/r. J. Bact. 58 (1949) 317 - 326
- (86) Nickson, J.J. (Edit.) : Symposium on radiobiology. The basic aspects of radiation effects on living systems. Oberlin College June 14 - 18, 1950. John Wiley and Sons, New York, 1952.
- (87) Paine, T.F.jr., and Clark, L.S. : The effect of streptomycin on oxygen uptake and viability of resting suspensions of Escherichia coli. Science 118 (1953) 73 - 74

- (88) Pauly, H. : Untersuchungen über den Einfluß von Röntgenstrahlen auf den Zellstoffwechsel und auf Enzyme. Dissertation, Frankfurt/M., 1957
- (89) Pauly, H. : Über elementare Mechanismen der Strahlenwirkung, in der lebenden Zelle. Habilitationsschrift, Frankfurt/M., 1959
- (90) Pauly, H., und Rajewsky, B. : Die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf den Zellstoffwechsel und auf Enzyme. Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft 1958, S. 127 - 183
- (91) Pollard, E., and Macauley, P. : The effect of oxygen during irradiation on the uptake of phosphor and sulfur by irradiated cells of Escherichia coli. Rad. Res. 15 (1961) 120 - 125
- (92) Pugsley, A.T., Oddie, T.H., and Eddy, C.E. : The action of x-rays on certain bacteria. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 118 (1935) 276 - 298
- (93) Rajewsky, B. : Physikalische Darstellung des Schädigungsvorgangs und ihre experimentelle Prüfung. In: Dessauer, 10 Jahre Forschung, S.202-235
- (94) Rajewsky, B. : The limits of the target theory of the biological action of radiation. Brit. J. Rad. 25 (1952) 550 - 552
- (95) Rajewsky, B., Aurand, K., Hug, O., Mergler, H., Muth, H., Pauly, H., Six, E., und Wolf, I. : Strahlendosis und Strahlenwirkung. G. Thieme, Stuttgart, 1954
- (96) Rajewsky, B., und Dänzer, H. : Über einige Wirkungen von Strahlen. VI. Eine Erweiterung der statistischen Theorie der biologischen Strahlenwirkung. 1. Teil. Zs. f. Physik 89 (1934) 412 - 420
- (97) Rajewsky, B., und Inouye, K. : α - Strahlenwirkung auf überlebendes Gewebe. Naturwiss. 25 (1937) 540 - 541

- (98) Read, J. : Physical aspects of the biological action of ionizing radiations. Brit. J. appl. Phys. 2 (1951) 337 - 345
- (99) Read, J. : The effect of ionizing radiations on the broad bean root. X. The dependence of the x-ray sensitivity on dissolved oxygen. Brit. J. Rad. 25 (1952) 89 - 99; 154 - 160
- (100) Read, J. : Mode of addition of x-ray doses given with different oxygen concentrations. Brit. J. Rad. 25 (1952) 336 - 338
- (101) Read, J. : The effect of ionizing radiations on the broad bean root. XI. The dependence of the alpha-ray sensitivity on dissolved oxygen. Brit. J. Rad. 25 (1952) 651 - 661
- (102) Roberts, R.B., Cowie, D.B., Abelson, P.H., Bolton, E.T., and Britten, R.J. : Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. Carnegie Institution of Washington Publication 607; Washington, 1955
- (103) Sargent, T. : Effects of pH and anoxia on the cell morphology and x-ray sensitivity of *Escherichia coli*. Rad. Res. 14 (1961) 323 - 336
- (104) Six, E. : Zur Treffertheorie der indirekten Strahlen-Wirkung. Zs. f. Naturf. 9 b (1954) 265 - 273
- (105) Stapleton, G.E. : The influence of pretreatments and post-treatments on bacterial inactivation by ionizing radiations. Ann. N. Y. Acad. Sci. 59 (1955) 604 - 618
- (106) Stapleton, G.E. : Factors modifying sensitivity of bacteria to ionizing radiations. Bact. Rev. 19 (1955) 26 - 32

- (107) Stapleton, G.E. : Variations in the sensitivity of *Escherichia coli* to ionizing radiations during the growth cycle. *J. Bact.* 70 (1955) 357 - 362
- (108) Stapleton, G.E. : Protection and recovery in bacteria and fungi. In: Hollaender, Radiation protection and recovery (1960) Chap. 4, S. 87 - 116
- (109) Stapleton, G.E., Billen, D., and Hollaender, A. : The role of enzymatic oxygen removal in chemical protection against x-ray inactivation of bacteria. *J. Bact.* 63 (1952) 805-811
- (110) Stapleton, G.E., and Hollaender, A. : Mechanisms of lethal and mutagenic action of ionizing radiations on *Aspergillus terreus*. II. Use of modifying agents and conditions. *J. cell. comp. Physiol.* 39 (1952) Suppl. 1, 101 - 113
- (111) Stapleton, G.E., Hollaender, A., and Martin, F.L. : Mechanisms of lethal and mutagenic action of ionizing radiations on *Aspergillus terreus*. I. Relationship of relative biological efficiency to ion density. *J. cell. comp. Physiol.* 39 (1952) Suppl. 1, 87 - 100
- (112) Thoday, J.M., and Read, J. : Effect of oxygen on the frequency of chromosome aberrations produced by x rays. *Nature* 160 (1947) 608
- (113) Timofëeff-Ressovsky, N.W., und Zimmer, K.G. : Das Trefferprinzip in der Biologie. S. Hirzel Verlag, Leipzig, 1947
- (114) Wallis, W.A., und Roberts, H.V. : Methoden der Statistik. Rudolf Haufe Verlag, Freiburg/Br., 1960

- (115) Webo, A.M., and Loofsbourow, J.R. : Intercellular hormones.
6. Release and synthesis of factors of
the vitamin B complex by damaged living
cells. *Biochem. J.* 41 (1947) 114 - 119
- (116) Weiss, J. : Radiochemistry of aqueous solutions.
Nature 153 (1944) 743 - 750
- (117) Wels, P. : Über einige kolloidchemische und
chemische Strahlenwirkungen und ihre
biologische Bedeutung. *Strahlenther.* 50
(1937) 355 - 380
- (118) Winslow, C.E.A., and Walker, H.H. : The earlier phase of
the bacterial culture cycle. *Bact. Rev.*
3 (1939) 147 - 186
- (119) Witkin, E.M. : Inherited differences in sensitivity to
radiation in *Escherichia coli*. *Proc.*
Nat. Acad. Sci. USA 32 (1946) 59 - 68
- (120) Wyckoff, R.W.G. : The killing of certain bacteria by x-
rays. *J. Exp. Med.* 52 (1930) 435 - 446
- (121) Wyckoff, R.W.G. : The killing of colon bacilli by x-rays
of different wavelengths. *J. Exp. Med.*
52 (1930) 769 - 780
- (122) Wyckoff, R.W.G. : The irradiation of microorganisms. *Acta*
Internat. Union against Cancer 4 (1939)
231
- (123) Wyckoff, R.W.G., and Rivers, T.M. : The effect of cathode
rays upon certain bacteria. *J. Exp. Med.*
51 (1930) 921 - 932
- (124) Zelle, M.R., and Hollaender, A. : Effects of radiation on
bacteria. In: Hollaender, *Radiation*
biology, Vol. II (1955) Chap. 10, S.
365 - 430

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. phil. nat.,
Dr. med. h.c., Dr. med. h.c. B. Rajewsky danke ich für die
Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes im Max Planck-
Institut für Biophysik sowie für seine ständige Unterstützung.

Herrn Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly danke ich für die
Fretreuung der Arbeit.

Darüberhinaus möchte ich auch einer Reihe von Mitarbeitern
des Instituts für manche Diskussion und wertvolle Ratschläge
danken.

Lebenslauf.

Ich wurde am 9. Februar 1929 in München geboren und bin die Tochter des Oostbauinspektors Karl Kraft und seiner Ehefrau Theresia, geb. Wittmann.

Seit 1930 lebe ich in Tiengen/Oberrhein. Dort besuchte ich von 1935 - 1939 die Volksschule und anschließend die Hochrheinschule (Oberrealschule) in Waldshut bis zur Reifeprüfung im Jahre 1948.

Im Wintersemester 1948/49 begann ich an der Universität Freiburg i. Br. mit dem Studium der Physik, Mathematik und Chemie, legte im Jahre 1950 die Diplomphysiker-Vorprüfung ab und im Jahre 1954 die Diplomphysiker-Hauptprüfung. Das Thema meiner Diplomarbeit, welche ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Gentner anfertigte, war: "Radioaktivitätsmessung mit der photographischen Platte".

Danach studierte ich in Frankfurt/M. Biophysik und fertigte unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. B. Rajewsky die vorliegende Arbeit an.

